

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Avances en el diagnóstico de la hematuria vesical
enzoótica bovina en el Perú**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Víctor Agape Guzmán Silva

ASESOR

Alfonso Chavera Castillo

Lima – Perú

2010

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1. Importancia económica de la ganadería bovina en el país	4
2.2. Historia de la hematuria vesical enzoótica bovina	6
2.3. Etiología de la enfermedad	7
2.3.1. <i>Pteridium aquilinum</i> (Pa)	7
2.3.1.1. Clasificación	7
2.3.1.2. Descripción botánica	8
2.3.1.3. Subespecies y variedades	9
2.3.1.4. Distribución geográfica	10
2.3.1.5. Compuestos tóxicos	10
2.3.1.5.1. Tiaminasa	12
2.3.1.5.2. Ptaquilósido	12
2.3.1.5.2. Quercetina	13
2.3.1.5.4. Otros compuestos tóxicos	14
2.4. Epidemiología	15
2.4.1. Distribución geográfica de la HVEB	15
2.4.2. Prevalencia e incidencia	15
2.4.3. Factores de riesgo	16
2.4.3.1. Clima y características de la región	16
2.4.3.2. Especie y edad	17
2.4.3.3. Raza y sexo	17
2.4.3.4. Dieta	17

2.4.3.5. Papilomavirus	18
2.5. Signos clínicos	20
2.5.1. Signos agudos	21
2.5.2. Signos crónicos	22
2.5.3. Signos digestivos	23
2.6. Fisiopatología	23
2.7. Lesiones	25
2.7.1. Lesiones macroscópicas	25
2.7.2. Lesiones microscópicas	27
2.7.3. Tumores de la vejiga urinaria	28
2.7.3.1. Tumores epiteliales	29
a. Papiloma	29
b. Adenoma	30
c. Carcinoma de células transicionales	30
d. Carcinoma de células escamosas	31
e. Adenocarcinoma	31
f. Carcinoma indiferenciado	33
2.7.3.2. Tumores no epiteliales	33
a. Tumores musculares	33
b. Tumores vasculares	34
c. Tumores fibroblásticos	35
d. Otros tumores	35
2.7.3.3. Tumores epiteliales-mesenquimales	35
2.7.3.4. Tumores secundarios	35
2.7.3.5. Tumores no clasificados	36
2.7.3.6. Cambios proliferativos	36

2.7.4. Lesiones en el tracto digestivo superior	37
2.8. Diagnóstico	37
2.8.1. Examinación y signos clínicos	38
2.8.2. Histopatología	38
2.8.3. Inmunohistoquímica	39
2.8.4. Hematología	41
2.8.5. Bioquímica clínica	42
2.8.6. Urianálisis	43
2.8.7. Cistoscopia	46
2.8.8. Ecografía	47
2.8.9. Otros análisis diagnósticos	48
2.9. Diagnóstico diferencial	48
2.10. Tratamiento	49
2.11. Pronóstico	50
2.12. Prevención y control	51
2.13. Importancia de la HVEB en la salud pública	51
2.14. Avances en el diagnóstico de la hematuria vesical enzoótica bovina en el país	53
III. CONCLUSIONES	59
IV. RECOMENDACIONES	60
V. LITERATURA CITADA	61

LISTA DE CUADROS

N°	Título	Pág.
Cuadro 1.	Cuantificación promedio de ptaquilósidos en <i>Pteridium aquilinum</i>	12
Cuadro 2.	Clasificación histológica de lesiones de vejiga urinaria y detección de ADN del VPB-2	20
Cuadro 3.	Valores hematológicos, bioquímicos y minerales plasmáticos de vacas con hematuria vesical enzoótica bovina y bovinos control saludables.	41
Cuadro 4.	Características de la orina de bovinos y algunas observaciones	43
Cuadro 5.	Análisis de orina y su relación con la HVEB	45
Cuadro 6.	Extensión y tipo de lesiones vesicales halladas en bovinos de Oxapampa con HVEB (2003)	58
Cuadro 7.	Tipos de lesiones tumorales vesicales halladas en bovinos de Oxapampa con HVEB (2003)	59
Cuadro 8.	Número de eritrocitos observados por campo y relación con el color de orina en el trabajo de Verde (2009)	67
Cuadro 9.	Comparación de resultados entre el uso de la Tira Reactiva y la Evaluación Microscópica del Sedimento Urinario en bovinos con HVEB	69

LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
Figura 1.	Producción láctea en diferentes departamentos del Perú	5
Figura 2.	<i>Pteridium aquilinum</i>	8
Figura 3.	Características botánicas de <i>P. aquilinum</i>	9
Figura 4.	Cantidad de ptaquilósido en el helecho según la edad	11
Figura 5.	Relación entre la altitud y la cantidad de ptaquilósido presente en las hojas de helecho	11
Figura 6.	Distribución geográfica de diferentes variedades de <i>P. aquilinum</i> .	12
Figura 7.	Representación química del ptaquilósido	14
Figura 8.	Representación química de la quercetina	15
Figura 9.	Hematuria	24
Figura 10.	Reacciones sufridas por el ptaquilósido en medios alcalinos	26
Figura 11.	Esquema de la fisiopatología de la HVEB	27
Figura 12.	Hemangioma vesical	28
Figura 13.	Carcinoma de células transicionales	34
Figura 14.	Carcinoma de células escamosas	34
Figura 15.	Leiomioma en HVEB	36
Figura 16.	Análisis microscópico del sedimento urinario	44
Figura 17.	Técnica inmunohistoquímica utilizando anti-vimentina	49
Figura 18.	Porcentaje de casos registrados de HVEB en la provincia de Oxapampa	57
Figura 19.	Observación histológica de un nido angioblástico	59

Figura 20.	Diagnóstico de carcinoma utilizando inmunohistoquímica	60
Figura 21.	Diagnóstico de hemangiosarcoma y nidos angioblásticos utilizando inmunohistoquímica	61
Figura 22.	Diagnóstico de hemangiosarcoma utilizando inmunohistoquímica	61
Figura 23.	Vejiga con edema en suburotelio y presencia de petequias en la superficie del urotelio a los 60 días de iniciado el estudio en cobayos	63
Figura 24.	Vejiga con carcinoma de células transicionales infiltrativo y papilar del urotelio a los 60 días de iniciado el estudio en cobayos (Tinción hematoxilina y eosina)	64
Figura 25.	Linfoma pulmonar con múltiples formaciones foliculares compactas de linfocitos atípicos y moderada bronconeumonía mucocatarral hemorrágica linfoplasmodiaria difusa crónica en cobayos (Aumento 40x)	64
Figura 26.	Linfoma maligno linfonodular mesentérico en cobayo. (Tinción hematoxilina y eosina)	65
Figura 27.	Tiras reactivas para uroanálisis en humanos	66
Figura 28.	Muestra de orina de bovino con HVEB	66
Figura 29.	Visualización de eritrocitos en la evaluación microscópica del sedimento urinario	68
Figura 30.	Colección de muestra de orina tras la estimulación de la zona perineal, 2008	70
Figura 31.	Aplicación de capa de colorante Wright sobre la muestra fija en el portaobjetos	70
Figura 32.	Sedimento urinario de vacuno hembra donde las flechas rojas señalan células exfoliadas uroteliales	71

	normales y las flechas verdes señalan grupos de eritrocitos (Tinción Wright 4X)	
Figura 33.	Sedimento urinario de vacuno hembra donde se aprecian grupos de células epiteliales exfoliadas uroteliales de apariencia normal (Tinción Wright 40X)	71
Figura 34.	Sedimento urinario donde la flecha roja señala una célula epitelial atípica de citoplasma levemente basófilo y de gran tamaño nuclear, exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X)	72

I. INTRODUCCIÓN

La hematuria vesical enzoótica bovina (HVEB) es una enfermedad crónica no infecciosa causada por el consumo continuo de pequeñas cantidades del helecho *Pteridium aquilinum* durante un tiempo aproximado de 2 a 3 años. Es un síndrome común en bovinos de 4 a 12 años de edad (Borzacchiello *et al.*, 2003; França *et al.*, 2002). La presentación de HVEB ha sido reportada en diversas partes del mundo, en especial en áreas templadas y asociadas a tierras poco fértiles o poco cultivadas (Sánchez *et al.*, 1999). Se ha reportado en países como Brasil, Venezuela, Estados Unidos, Bulgaria, Escocia, Irán o Kenia (Anjos *et al.*, 2008; Gaste y Sánchez, 2008; Sánchez *et al.*, 1999 y 2008). En Perú, la HVEB ha sido reportada en la zona de Oxapampa, Cerro de Pasco y Pucallpa siendo una de las enfermedades que más afectan al ganado bovino de crianza al pastoreo (Gonzáles y Carpio, 1973; Gonzáles *et al.*, 2004).

P. aquilinum es una planta que pertenece a la familia de las Hipolepidáceas. Se desarrolla de manera rápida entre los pastizales perennes y a pesar de un bloqueo parcial de la luz solar (Sánchez *et al.*, 1999). Este helecho está entre las cinco plantas más comunes del mundo y es la única planta superior que se **conoce** causa neoplasias naturalmente en los animales, como consecuencia de una considerable cantidad de componentes tóxicos, dentro de los cuales está el ptaquilósido (PT), un componente radiomimético glucósido sesquiterpenoide capaz de inducir clastogénesis en los cultivos celulares con actividad mutagénica y carcinogénica (Riet-Correa *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2003). El

PT es eliminado en la orina induciendo tumores vesicales y también es eliminado en la leche, con potencial riesgo para la salud humana (Alonso-Amelot, 1999).

La incidencia global de la enfermedad no es muy grande, pero es importante en la ganadería porque causa un gran impacto económico debido a la pérdida prematura de animales. Por otro lado, no hay un tratamiento específico de la enfermedad por lo que se opta por el sacrificio de los animales afectados (Radostits *et al.*, 2002; Giles y Andrews, 2004). Entre los signos clínicos y patológicos observados se encuentran la anemia, leucopenia, reducida hemoglobina, hemorragias de la pared vesical, disuria y escasa productividad del animal (Prasad e Iyer, 1986; Sandoval *et al.*, 2002). El animal puede morir tras una enfermedad de 1 a 2 semanas en los casos agudos; en los casos menos graves con hematuria intermitente o subclínica persistente, se observa un empeoramiento progresivo del estado general del animal a lo largo de varios meses (Riet-Correa *et al.*, 2001; Jackson y Cockcroft, 2002; Radostits *et al.*, 2002).

La enfermedad también está asociada con cambios neoplásicos en la mucosa de la vejiga. Las lesiones neoplásicas observadas generalmente son hemangioendotelomas, adenocarcinomas, carcinomas de células transicionales, papilomas, fibromas, leiomiomas, carcinomas de células escamosas y mixomas (França *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2003).

Para el diagnóstico presuntivo bastan los signos clínicos con los datos epidemiológicos de la zona (Prasad e Iyer, 1986). Sin embargo, para llegar a un diagnóstico definitivo hay que tomar en cuenta la historia de la enfermedad, los signos clínicos y la histopatología hallada en las lesiones. En la actualidad se han desarrollado diversas pruebas diagnósticas como la histopatología (Vargas *et al.*, 2003), patología clínica (Sánchez *et al.*, 2004), ecografía (Hoque *et al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2002), tiras reactivas para orina, examen microscópico del sedimento urinario (Sánchez *et al.*, 2006), PCR semi-anidada para la detección y tipificación de Papilomavirus bovino tipo 2 en las lesiones

vesicales (Stocco dos Santos *et al.*, 1998), hibridación por Southern blot (Saveria *et al.*, 1992) detección de gangliósidos y glucoesfingolípidos que modulan la señalización celular esencial para la proliferación, invasión y metástasis tumoral (Roperto *et al.*, 2007), e incluso la detección de aberraciones cromosomales relacionadas a la enfermedad (Lioi *et al.*, 2004).

El presente trabajo realiza una revisión de la literatura sobre la HVEB, con énfasis en las herramientas que se tienen para el diagnóstico, para contribuir al conocimiento actual de la enfermedad en el Perú y brindar una mejor perspectiva para la implementación de **adecuadas** medidas de control **detectando animales precozmente**, evitar pérdidas económicas en la ganadería y mejorar la protección de la salud pública.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia económica de la ganadería bovina en el país

La ganadería bovina constituye un importante sector en la economía del país, no sólo como fuente de alimento sino también como fuente de trabajo para la población (Gamarra, 2001). Sin embargo, el Perú es uno de los países de Sudamérica en los que se consume y produce menor cantidad de leche en Sudamérica, con un consumo y producción **per cápita** de tan solo 46 y 42 kg, respectivamente inferiores a los que recomienda la FAO (MINAG, 2010).

En las diferentes regiones del país se tienen diferentes sistemas de manejo que influyen en la producción láctea y de carne bovina. Por ejemplo, la cuenca lechera del sur del país es una de las principales fuentes abastecedoras de leche en el Perú. Más del 90% de la producción de esta cuenca **se lleva a cabo en** Arequipa, con la irrigación de Majes produciendo más del 40% de la leche con un sistema semi-intensivo combinando estabulación y pastoreo de leguminosas, principalmente alfalfa (Olivera, 2001).

En la sierra, el sistema de manejo es principalmente extensivo, criando la ganadería bovina con pastos naturales. La producción lechera por vaca es baja debido al pobre rendimiento forrajero de estos pastos naturales. Los animales criados son principalmente criollos y la mano de obra es familiar (Aubron y Cochet, 2009). Finalmente, en la selva se cría ganado de doble propósito con un sistema de explotación que se caracteriza por tener vacas al pastoreo que

amamantan a sus terneros, un ordeño al día, escaso uso de suplementos alimenticios y diversidad de razas criadas. Es un sistema típico de las regiones tropicales húmedas de Latinoamérica (Sheen y Riesco, 2002).

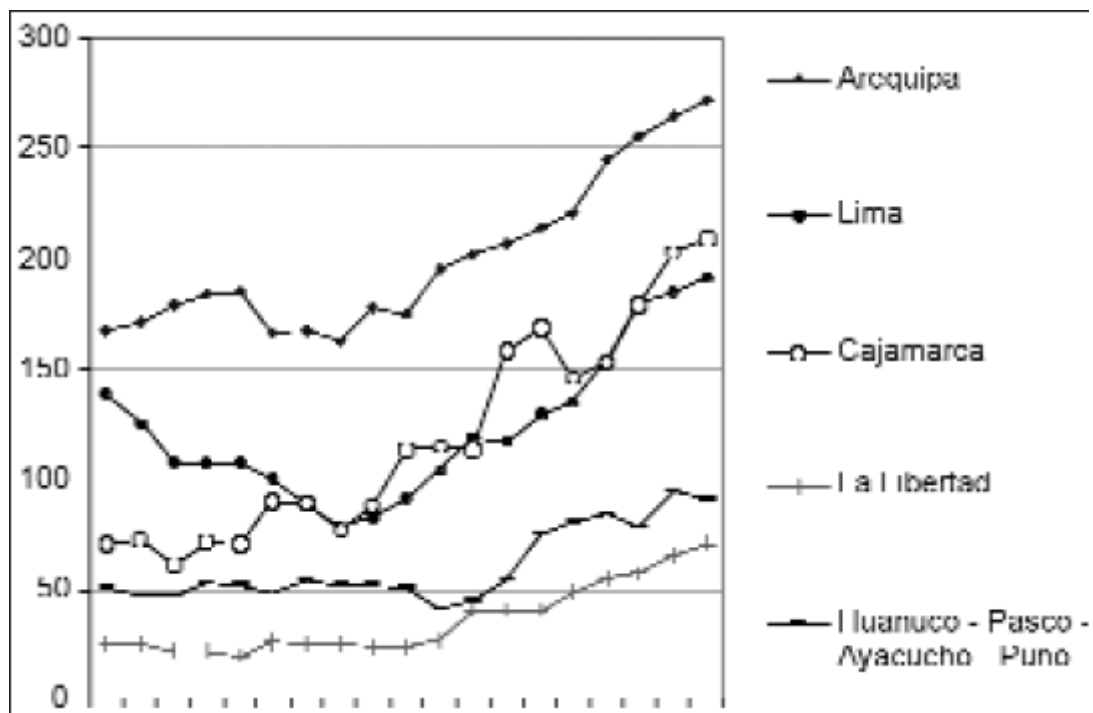


Figura 1. Producción láctea en diferentes departamentos del Perú

Fuente: Aubron y Cochet (2002)

En nuestro país, el sector lechero se está integrando progresivamente a la economía global, caracterizada por exportaciones e importaciones privadas de productos y subproductos lácteos, menor intervención del gobierno y por las inversiones foráneas en la industria lechera (Gamarra, 2001). Sin embargo, a veces se deja de lado el mejoramiento de la sanidad de los animales de producción.

Una de las enfermedades poco comprendidas es la hematuria vesical enzoótica bovina (HVEB) a pesar que produce enormes pérdidas económicas que afectan principalmente a las comunidades rurales donde la venta de carne y leche de bovinos es la principal fuente de ingresos familiares (Marrero *et al.*, 2001). Como ejemplo del impacto de esta enfermedad, el trabajo de Gonzáles (2003) analizó muestras de mucosa vesical de 173 bovinos procedentes de los

diferentes distritos de la provincia de Oxapampa de diferentes edades, raza, sexo y procedencia y halló 41 animales (23.7%) con lesiones compatibles con HVEB.

2.2. Historia de la hematuria vesical enzoótica bovina

Los efectos tóxicos del helecho común fueron reportados primero por Tophan en 1787 (Somvanshi y Ravisankar, 2004). Posteriormente, en 1893, en Inglaterra, hubo una gran sequía que comenzó en la primavera y duró todo el verano, el único alimento que persistió fue el helecho común. Muchos bovinos sufrieron una enfermedad hemorrágica similar al ántrax. Al año siguiente, el síndrome fue reproducido experimentalmente por la alimentación de vacas con helecho (Bidault, 2009).

Asimismo, la etiología de la intoxicación aguda con helecho fue redescubierta en la década de 1920 por Stockman y Kerdiles. Unas décadas más tarde, en 1955, Pamukcu observó bovinos y búfalos con hematuria en Turquía y se dio cuenta que la presencia de *Pteridium aquilinum* era una constante en las áreas de presentación de HVEB (França *et al.*, 2002). No obstante, la relación etiológica entre la ingestión de helecho y la hematuria crónica recién fue comprobada en 1960 por Rosenberger (Gründer, 2005).

En nuestro país esta enfermedad se presenta en muchos lugares de la amazonía, con variada incidencia. Se tiene conocimiento del reporte de HVEB en Pucallpa (Gonzáles y Carpio, 1973), en el valle de Oxapampa (López, 1983) y en los valles del Huallaga (San Martín) y Pichis Palcazu (Pasco) (Velarde, 1991). En la actualidad, se han realizado diversos estudios sobre diferentes aspectos de esta enfermedad. Gonzáles (2003) realizó el primer reporte oficial de la HVEB, seguido de Montes (2007), Ramos (2009), Verde (2009), Herencia (2009) y Peredo (2010) que han realizado diversos estudios en nuestro país reportando prevalencias y analizando técnicas de diagnóstico para la HVEB, así como, estudios experimentales de dicha enfermedad.

2.3. Etiología de la enfermedad

La hematuria vesical enzoótica bovina (HVEB) es un síndrome crónico o intermitente del ganado vacuno asociado con la ingesta crónica del helecho común (*Pteridium aquilinum*). Otras especies de helechos como *Cheilanthes sieberi* y *P. esculentum* en Australia o *P. revolutum* en China pueden ser la causa de esta enfermedad en el ganado de otros países (Grant y Newman, 2007; Bidault, 2009).

La ingesta continua de helecho verde o seco provoca en el bovino, luego de un período asintomático prolongado, de por lo menos 15 a 30 días, graves daños de la médula ósea hematopoyética, especialmente alteraciones de la trombocitopoyesis y mielopoyesis (Gründer, 2005; Lorgue *et al.*, 1997). Este síndrome se caracteriza principalmente por hematuria persistente y anemia, y tiene una asociación con hemorragias y neoplasias en el tracto urinario inferior (Grant y Newman, 2007).

2.3.1. *Pteridium aquilinum*

2.3.1.1. Clasificación

El helecho *Pteridium aquilinum*, también llamado antiguamente *Pteris aquilina* o águila imperial, helecho común, helecho hembra, falguera, foguera (Roder, 2002), pertenece a la familia de las hipolepidáceas (Lorgue *et al.*, 1997). La clasificación taxonómica de *P. aquilinum* (L.) Kuhn es la siguiente:

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Pteridophyta</i>
Clase:	<i>Filicopsida</i>
Orden:	<i>Dennstaedtiaceae</i>
Familia:	<i>Hypolepidaceae</i>
Género:	<i>Pteridium</i>
Especie:	<i>aquilinum</i>

2.3.1.2. Descripción botánica

P. aquilinum es una planta perenne que posee gruesos rizomas subterráneos cubiertos de pelos de color castaño que dan grandes hojas muy divididas y con esporangios reunidos en un raquis robusto marrón o negruzco en la cara inferior de las pínulas (Lorgue *et al.*, 1997; McWhirter y Kemp, 2010). Este helecho carece de flores verdaderas y en su lugar se organizan unas estructuras reproductoras llamadas soros (Rasmussen, 2003).

Este helecho se distingue de los demás por los esporangios, receptáculos que contienen las esporas, que están dispuestos cerca del borde del envés de las hojas y están cubiertos por un pliegue protector. La forma de propagación a través de rizomas hace difícil su control y erradicación (Alonso-Amelot, 1999; McWhirter y Kemp, 2010).



Figura 2. *Pteridium aquilinum*

Fuente: Internet



Figura 3. Características botánicas de *P. aquilinum*

Fuente: Internet

2.3.1.3. Subespecies y variedades

Hay dos subespecies de helechos: *Pteridium aquilinum* subespecie *aquilinum*, que contiene ocho variedades y *P. aquilinum* subespecie *caudatum*, que contiene cuatro variedades. Actualmente no se sabe si todas las variedades son tóxicas (Grant y Newman, 2007).

Las variedades mejor descritas de *P. aquilinum* subespecie *aquilinum* son *aquilinum*, *decompositum*, *pubescens*, *feel latiusculum*, *wrightianum*, *pseudocaudatum* y *africanum*. Las variedades de la subespecie *caudatum* mejor conocidas son *caudatum*, *esculentum*, *arachnoideum* y *revolutum* (Marín et al., 2004). La variedad *yarrabense* es un híbrido de *esculentum* x *revolutum* (Rasmussen, 2003).

2.3.1.4. Distribución geográfica

El helecho es una de las plantas más comunes del planeta y se dice que es la única planta que causa una presentación natural de tumores en animales (Grant y Newman, 2007). Crece en terrenos silíceos (Lorgue *et al.*, 1997) y ciertas laderas montañosas o valles con ganadería extensiva, con la flora de los suelos mal trabajados, ácidos y pobres en fósforo, están compuestas mayoritariamente de helechos (Gründer, 2005).

El helecho *Pteridium* está ampliamente distribuido en Europa: Reino Unido, Alemania, Suiza y los Balcanes (Gründer, 2005), Francia (Champagne, 2004), Portugal (Resendes *et al.*, 2010), Italia (Borzacchiello *et al.*, 2003), Dinamarca (Rasmussen, 2003). En la península ibérica se presenta principalmente en zonas boscosas, afectando vacas lecheras y bovinos de carne en explotación extensiva por encima de los mil metros (Roder, 2002). En África ha sido descrito ampliamente en la India (Mengi *et al.*, 2001; Dawra *et al.*, 2002) y Turquía (Pamukcu, 1976).

En el continente americano, *P. aquilinum* está distribuido en la totalidad de los Estados Unidos donde crece en áreas pobres y húmedas, preferentemente áreas templadas montañosas y forestales. Puede llegar a ser **rápida** y relativamente dominante en una pastura (Carlyle y Duncan, 1990; Giles y Andrews, 2004). También existen reportes de Costa Rica (Villalobos, 1985), Venezuela (Sánchez *et al.*, 1999a), Colombia (Delgado *et al.*, 2009), Brasil (Riet-Correa *et al.*, 2001), Bolivia (Marrero *et al.*, 2001) y Perú (González y Carpio, 1973). No se tiene conocimiento de reportes de la enfermedad en Ecuador.

2.3.1.5. Compuestos tóxicos

Los rizomas, expuestos después del arado de las pasturas infestadas de helecho son más atractivos y peligrosos **debido a las** hojas jóvenes recientemente germinadas (Cuadro 1). Las dosis tóxicas son poco conocidas,

sin embargo, es necesaria la ingestión de grandes cantidades de helecho repetidamente (Lorgue *et al.*, 1997). Es considerada peligrosa una proporción mayor al 20% de helecho en la alimentación diaria (Gründer, 2005).

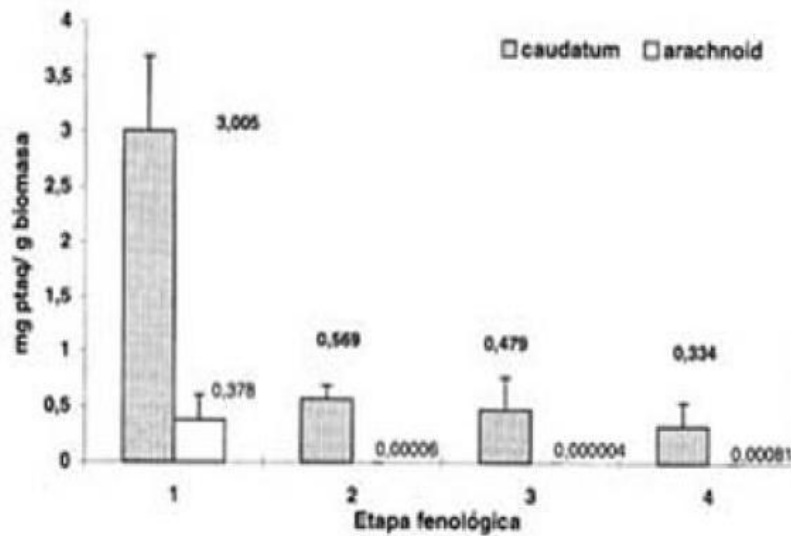


Figura 4. Cantidad de ptaquilósido en el helecho según la edad.

Fuente: Alonso-Amelot (1999).

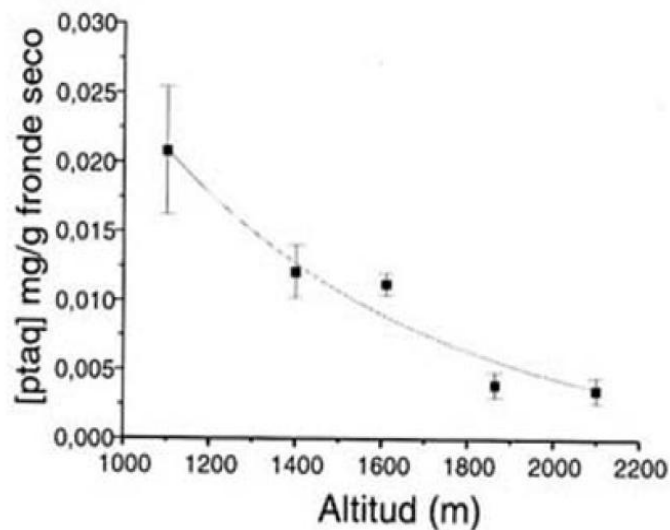


Figura 5. Relación entre la altitud y la cantidad de ptaquilósido presente en las hojas de helecho.

Fuente: Alonso-Amelot (1999).

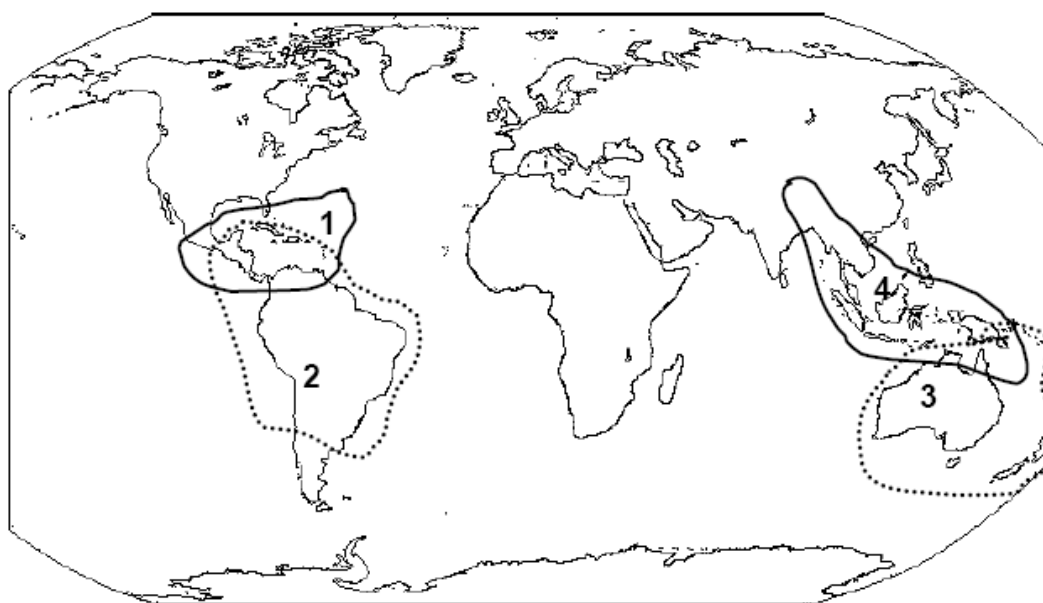


Figura 6. Distribución geográfica de diferentes variedades de *P. aquilinum*. 1: var. *caudatum*; 2: var. *arachnoideum*; 3: var. *esculentum*; 4: var. *yarrabense*.

Fuente: Rasmussen (2003).

Cuadro 1. Cuantificación promedio de ptaquilósidos en *Pteridium aquilinum*

Concentración de ptaquilósidos	(ng/g de materia seca)
Hojas	1465
Tallo	153
Total	1618

Fuente: Marín *et al.* (2004).

El helecho común contiene varios agentes potencialmente perjudiciales tales como componentes inmunosupresores y mutagénicos: un glucósido cianogenético, una tiaminasa, ptaquilósidos como la braxina C y el ptaquilósido Z, una quercetina, el aquilido A, un factor de anemia aplásica y un factor determinante de hematuria (Radostits *et al.*, 2002; Grant y Newman, 2007; Bidault, 2009), astragalina, ácido numérico y ácido succínico, d-econdisona, entre otros de menor importancia (Somvanshi y Ravisankar, 2004). El glucósido cianogenético es de poca importancia y sólo está presente en cantidades

inocuas aunque se han descrito muertes súbitas debidas probablemente al ácido cianhídrico producido en animales que habían ingerido hojas jóvenes (Clarke y Clarke, 1970; Giles y Andrews, 2004).

2.3.1.5.1. Tiaminasa

La tiaminasa, una enzima hidrolizante de la vitamina B₁, es responsable de la intoxicación en monogástricos, pero a diferencia de la situación en los herbívoros no rumiantes, los bovinos no suelen ser afectados por ella (Clarke y Clarke, 1970; Lorgue *et al.*, 1997; Giles y Andrews, 2004) debido a la producción de tiamina por la microflora ruminal. Hay grandes concentraciones de tiaminasa en el rizoma, más que en las hojas o en el tallo (Roder, 2002).

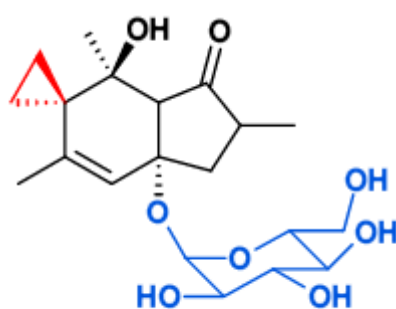
2.3.1.5.2. Ptaquilósido

El ptaquilósido es un glicósido nor-sesquiterpenoide, amorfo, incoloro, sumamente inestable y es clastogénico, mutagénico y carcinogénico. Se excreta por la orina, por lo tanto su efecto incide sobre la vejiga, además puede pasar a la leche, con riesgos potenciales para la salud pública (Marin *et al.*, 2004; Somvanshi *et al.*, 2006; Bidault, 2009).

El ptaquilósido es el principal causante de la enfermedad en los bovinos (Roder, 2002), sufre una serie de reacciones y produce un intermediario dienona aglicona reactivo, la pterosina B inactiva y también produce aductos de ADN. La dienona es el carcinógeno final (Somvanshi *et al.*, 2006). Las partes aéreas y los rizomas de helecho contienen el ptaquilósido, que es resistente a la henificación, es termolábil y soluble en alcohol. En rumiantes afecta la trombocitopoyesis y mielopoyesis (Gründer, 2005) ya que los glucósidos cianogenéticos presentes en las hojas jóvenes dan origen al ácido cianhídrico que interfiere directamente con varios procesos fisiológicos al unirse irreversiblemente con varias enzimas críticas como la citocromo C, la hemoglobina y la mioglobina muscular (Rasmussen, 2003).

El nivel de ptaquilósido ha sido estimado en diferentes países, incluyendo Australia y Nueva Zelanda, donde se halló que los helechos de diferentes variedades contenían desde 0 hasta 9776 mg/kg (promedio 1275 mg/kg) de ptaquilósido. El nivel de toxinas del helecho tiene una correlación positiva con la altitud y latitud (Somvanshi *et al.*, 2006).

Por otro lado, Dawra *et al.* (2002) hallaron una proporción de ptaquilósido de 3.74 ± 0.6 mg por kilogramo de hojas y Marín *et al.* (2004) hallaron 1465 ng de ptaquilósido por kilogramo de hojas. En la variedad *caudatum* se ha hallado una proporción de 0.4 a 1.70 mg de ptaquilósido por gramo de hojas frescas, dependiendo del lugar de colección de la planta (Alonso-Amelot *et al.*, 1998). Asimismo, algo de la toxicidad permanece cuando el helecho es secado para formar heno (Giles y Andrews, 2004).



Ptaquilósido

Figura 7. Representación química del ptaquilósido

Fuente: Internet

2.3.1.5.3. Quercetina

La quercetina (5,7,3',4'-tetrahidroflavona) es un flavonoide presente en altos niveles en el helecho. Tiene efectos principalmente mutagénicos y clastogénicos de los fragmentos de ADN de cadena sencilla y también causa reordenamientos cromosómicos (Bidault, 2009).

La quercetina interactúa con el virus del papiloma bovino en la transformación de células bovinas primarias. La quercetina sola induce mutaciones en bacterias, efectos clastogénicos en células cultivadas de mamíferos y, en las células se intercala dentro del ADN, causando rupturas de una sola hebra como consecuencia de la generación de radicales libres (Stocco dos Santos *et al.*, 1998).



Figura 8. Representación química de la quercetina

Fuente: Internet

2.3.1.5.4. Otros compuestos tóxicos

Otros compuestos tóxicos menos conocidos como el factor de la anemia aplásica y el factor determinante de hematuria deprimen la médula ósea y destruyen las células precursoras en dicha médula (Blowey y Weaver, 2003; Giles y Andrews, 2004). Estas sustancias no están identificadas plenamente, pero se supone que también son responsables de las alteraciones observadas en los bovinos. Los efectos sobre la médula ósea son acumulativos (Lorgue *et al.*, 1997). Otros carcinógenos potenciales son los taninos, el ácido shikimico, la prunasina y el kaemferol (Roder, 2002; Grant y Newman, 2007).

2.4. Epidemiología de la HVEB

2.4.1. Distribución geográfica de la HVEB

La HVEB se manifiesta como un problema regional en todos los continentes (Radostits *et al.*, 2002; Blowey y Weaver, 2003). Se han reportado intoxicaciones en bovinos de Gran Bretaña, Italia (Borzacchiello *et al.*, 2003), Estados Unidos (Carlyle y Duncan, 1990), Argentina (Marín *et al.* 2004), Venezuela (Sánchez *et al.*, 2003), Perú (González *et al.*, 2004), sur de la India, Java y Filipinas, entre otros países. Otros eventos patológicos causados por *P. aquilinum* además de la HVEB son los carcinomas del tracto digestivo superior, el síndrome hemorrágico en bovinos y ovejas, los tumores intestinales y la degeneración retinal progresiva en ovinos (França *et al.*, 2002).

2.4.2. Prevalencia e incidencia

La incidencia global no es grande pero la enfermedad puede causar pérdidas importantes en las zonas donde el helecho común es una plaga habitual. La enfermedad suele ser mortal. La intoxicación se limita a las tierras pobres, abandonadas y tiende a desaparecer a medida que mejoran la fertilidad y el cultivo. No existe una asociación estrecha con un tipo de suelo concreto, aunque parece ser más frecuente en los suelos más ligeros. La cantidad de ptaquilósido presente en el helecho común varía mucho según las distintas localizaciones geográficas y existe buena correlación entre su concentración y la incidencia de neoplasias (Radostits *et al.*, 2002). En Brasil se ha reportado una morbilidad del 70% y una mortalidad de hasta 100% (Riet-Correa *et al.*, 2001).

En el trabajo realizado en el año 2001 por Marrero *et al.*, la vigilancia de las granjas afectadas en el Chaco Húmedo de la provincia de Tarija en Bolivia reportó un incremento de la HVEB en los últimos 20 años, con la incidencia incrementándose hasta un 10.6%. Por otro lado, en el trabajo de Dawra *et al.* (2002) se reportan prevalencias de 0.8% a 11.5% en diferentes zonas de la

India. En el continente americano, el estudio de Sánchez *et al.* (2003) en el Estado de Mérida, Venezuela, reportó 92 animales (16.0%) positivos a HVEB de un total de 575 bovinos lecheros examinados; en Brasil, Silva *et al.* (2009) han reportado una prevalencia de 12.15% en bovinos de la microrregión de Caparaó; y en nuestro país recientemente se ha reportado una prevalencia de 26.1% en la zona endémica de Oxapampa (Verde, 2009).

2.4.3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo que predisponen a la toxicosis con plantas incluyen la flora de la región, las características del suelo, el clima regional y la invasión de especies vegetales indeseables con contenido químico perjudicial, como en el caso de *Pteridium aquilinum* (Marrero *et al.*, 2001). Asimismo, uno de los factores de riesgo más importantes también es la falta de educación e indiferencia frente a la problemática de establecer medidas de control del helecho (Sánchez *et al.*, 2003). A continuación también se describen algunos factores relacionados a la HVEB:

2.4.3.1. Clima y características de la región

Hay una estrecha relación entre las áreas enzóticas de HVEB y la distribución de *Pteridium aquilinum*. La intoxicación es más frecuentes en las épocas del año de escasez de forraje, al final del verano y en sequía (Roder, 2002). Por ejemplo, en Brasil las intoxicaciones agudas ocurren principalmente en el período comprendido entre Noviembre y Mayo (Riet-Correa *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el distrito de Pozuzo a 800 msnm, la HVEB es esporádica y se cree que es debido a la menor altitud en comparación a otros distritos con mayor altitud y mayor incidencia. También se propone que los suelos pobres en minerales como el calcio y fósforo, y con niveles altos de aluminio y pH ácido entre 3.5 a 5.5 favorecen la diseminación del helecho (López, 1983).

2.4.3.2. Especie y edad

Las vacas mayores de un año de edad son las afectadas con mayor frecuencia, aunque la enfermedad se observa también en búfalos de agua y ovejas expuestos a los pastos tóxicos durante períodos superiores a los 2 años (Radostits *et al.*, 2002; Bidault, 2009). En áreas endémicas, hasta el 90% de los bovinos adultos puede estar afectado (Grant y Newman, 2007).

El trabajo de investigación epidemiológica realizado por Sánchez *et al.* (1999b) en Mérida, Venezuela, utilizando encuestas epidemiológicas a los propietarios de los rebaños del sector determinó que uno de los principales factores de riesgo fue la edad. Los animales mayores de 24 meses tienen más probabilidad de ser afectados por la HVEB.

2.4.3.3. Raza y sexo

No hay preferencia de raza en la presentación de HVEB. Todas las razas son potencialmente susceptibles siempre y cuando tengan acceso al helecho. Según lo concluido del estudio de Marín *et al.* (2004), el signo clínico de orina con sangre es observado más frecuentemente en vacas (62.5%), luego en novillos (28.12%), toros (9.37%) y vaquillonas (6.25%), no hallándose este signo clínico en terneros. El trabajo epidemiológico de Sánchez *et al.* (1999b) no halló relación de la enfermedad con la raza y sexo de los animales.

2.4.3.4. Dieta

Frecuentemente los bovinos son renuentes a comer helecho y usualmente sólo lo harán cuando la pastura sea escasa. Los bovinos necesitan pastorear el helecho como un constituyente significativo de la dieta por varias semanas o meses antes de que la enfermedad clínica llegue a ser aparente (Giles y Andrews, 2004). Sánchez *et al.* (2006) han determinado que los bovinos

necesitan consumir aproximadamente 10 g/animal/día de ptaquilósido durante dos o tres años para que se presente la HVEB.

2.4.3.5. Papilomavirus

Como un hallazgo significativo en la investigación sobre la HVEB, el virus del papiloma bovino tipo 2 (VPB-2) (y en algunos reportes el VPB-4) puede estar involucrado conjuntamente con el hebrecho en el desarrollo de las neoplasias de la vejiga (Grant y Newman, 2007) y del tracto digestivo superior (Blowey y Weaver, 2003). Se ha demostrado experimentalmente que el virus del papiloma bovino tipo 2 (VPB-2) podría producir efectos clastogénicos en ausencia de la ingestión de hebrechos por el ganado. En el caso de HVEB, el virus se encuentra a menudo en las lesiones tumorales vesicales (Bidault, 2009).

Uno de los primeros trabajos realizados sobre la relación entre el VPB-2 y el hebrecho común en la producción de neoplasias vesicales es el estudio de Saveria *et al.* (1992) donde detectaron mediante hibridación Southern blot el ADN del VPB-2 en 46% de casos naturales de neoplasias vesicales (7 de 15) y en 69% (9 de 13) lesiones inducidas experimentalmente, independientemente del tipo histológico.

En 1998, Stocco dos Santos *et al.* identificaron el ADN del VPB-2 por Southern blot, PCR y secuenciación por ciclo de los productos de PCR en la sangre periférica de vacas afectadas con HVEB y en su progenie, concluyendo que el VPB puede ser transmitido a través de la sangre. Igualmente, hallaron una incrementada tasa de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de sangre periférica de estas mismas vacas afectadas crónicamente con HVEB sugiriendo que la infección con el virus causa las alteraciones clastogénicas observadas en la enfermedad. Asimismo, la investigación realizada por Lioi *et al.* (2004) determinó la presencia de PVB-2 en 11 de 27 tejidos tumorales de bovinos utilizando PCR.

El trabajo realizado por Balcos *et al.* (2008) halló ADN del VPB-2 en un alto porcentaje de tumores de diferentes tipos histológicos, procedentes de bovinos enfermos con HVEB, lo que confirma que los diferentes histotipos no están relacionados a la presencia viral. También fue hallada la expresión de la oncoproteína E5 en las muestras tumorales, lo que sugiere una estrecha asociación entre el VPB-2 y el cáncer de vejiga urinaria en bovinos. Por otro lado, Resendes *et al.* (2010) hallaron una prevalencia de infección con el VPB-2 de 28.2% en diferentes tipos de lesiones tumorales en vejiga urinaria, concluyendo que existe una relación entre la carcinogénesis y la infección por el VPB-2, corroborando además la amplia diseminación de este virus (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación histológica de lesiones de vejiga urinaria y detección de ADN del VPB-2.

Lesiones en vejiga urinaria	Número/tasa	Positivo a ADN del VPB-2
Carcinoma urotelial	27 (58.72%)	6 (46.1%)
Hemangiosarcoma	4 (8.7%)	2 (15.3%)
Sarcoma	3 (6.5%)	2 (15.3%)
Hemangioma y carcinoma mixto	3 (6.5%)	1 (7.6%)
Papiloma	7 (15.2%)	0 (0%)
Cistitis	2 (4.3%)	2 (15.3%)
Total	46 (100%) ^a	13 (100%)

^a Cuatro vacas tuvieron muestras duplicadas.

Fuente: Resendes *et al.* (2010).

La presencia del VPB en las células sanas, sin expresión de la proteína E5 muestra que la replicación del virus se produce sólo en el tumor, pero el virus puede permanecer latente en las células sanas en la vejiga en espera de la activación de la expresión de sus genes. Los productos químicos contenidos en los helechos son candidatos fuertes en esta función (Bidault, 2009).

2.5. Signos clínicos

Los bovinos muestran signos clínicos según la cantidad y duración de la alimentación con helecho. El tiempo de latencia entre el período de ingestión y el inicio de los signos clínicos es generalmente largo, de algunas semanas a 1 o 2 meses (Lorgue *et al.*, 1997; Roder, 2002). El comienzo de los signos clínicos puede retrasarse durante un período considerable tras la supresión del consumo de helecho (Clarke y Clarke, 1970).

La intoxicación se manifiesta por diátesis hemorrágicas hiperagudas o agudas o más insidiosamente como hematuria vesical crónica. Los signos recién se manifiestan después de la ingestión continua o intermitente prolongada (Gründer, 2005). La pérdida de peso, anemia, pérdida de sangre por los orificios corporales, prolongación del tiempo de coagulación y hematuria suelen ser los signos más constantes. Hay alta mortalidad (> 80%) asociada con la enfermedad clínica (Roder, 2002). Se ha reportado también diarrea e inflamación de las vías respiratorias (Carlyle y Duncan, 1990).

Examinaciones clínicas realizadas en animales enfermos en Tarija, provincia de Bolivia, mostraron una progresiva pérdida de peso que evolucionó hacia emaciación y mucosas externas pálidas. Las frecuencias respiratorias y cardíacas fueron variables así como la temperatura rectal (Marrero *et al.*, 2001), aunque también se ha reportado signos clínicos no febriles con frecuencias respiratorias y cardíacas, motilidad ruminal e ingesta de alimento normales, pero con disminución de la producción láctea (Mengi *et al.*, 2001).

Los casos menos graves se caracterizan por hematuria clínica leve e intermitente o por hematuria subclínica persistente. En estos casos existe un empeoramiento progresivo del estado general a lo largo de varios meses, que acaba con una anemia clínicamente evidente (Radostits *et al.*, 2002).

En terneros frecuentemente hay pirexia, disentería, hemorragia franca y petequias en las mucosas visibles. Puede haber edema de la laringe y marcada

disnea. Debido a la leucopenia, las bacteriemias y otras infecciones secundarias son las complicaciones frecuentes (Giles y Andrews, 2004).

2.5.1. Signos agudos

La toxicosis aguda ocurre por la ingestión de cantidades diarias de helecho común que superan los 10 g/kg de peso del animal por períodos que varían de 3 semanas a unos cuantos meses (Marçal, 2003). El resultado es la depresión de la médula ósea, lo que produce leucopenia y trombocitopenia. Los signos clínicos pueden desarrollarse hasta por varias semanas después que la exposición al helecho ha terminado (Giles y Andrews, 2004).

Los signos pueden ser de presentación repentina e incluyen anorexia, depresión y disentería, puede haber pirexia. También se observa salivación y moqueo. Llegan a ser obvios variados signos de fragilidad capilar y hemorragia, incluyendo petequias en las mucosas, sangrado del morro, vagina y conjuntiva. El trauma puede producir hematomas. Las tasas cardíaca y respiratoria están aumentadas. La ausencia de fiebre indica una causa no infecciosa (Rebhum, 1995; Lorgue *et al.*, 1997; Giles y Andrews, 2004). La vulva puede ser observada pálida debido a la severa anemia. Hay puntos hemorrágicos que son el resultado de la trombocitopenia. Las hemorragias en otros lados pueden causar epistaxis, hifema (sangrado en la cámara anterior del ojo) o hematuria por hemorragia de la mucosa de la vejiga (Blowey y Weaver, 2003; Bidault, 2009). En el 90% de los casos, la hematuria se origina de los tumores de la vejiga urinaria (Grant y Newman, 2007).

La fase aguda va precedida por un desmejoramiento del estado general y en algunos casos por excesiva secreción mucosa de la boca y nariz. Una o dos semanas más tarde son notables los signos clínicos de intoxicación aguda (Clarke y Clarke, 1970). La debilidad progresiva sobreviene y la muerte puede ocurrir en uno a cinco días (Giles y Andrews, 2004).

En el estudio de Anjos *et al.* (2009) sobre inducción experimental de intoxicación aguda con *P. aquilinum* en bovinos entre 190 y 225 kg de peso vivo, los animales murieron espontáneamente luego de un cuadro clínico agudo con una evolución de 5-6 días. Las dosis de helecho utilizadas en este trabajo fueron de 5 g por kg de peso corporal hasta 15 g/kg de peso corporal, lo que corresponde a una cantidad ingerida de helecho de 47.5%-59.3% del peso corporal de los animales.

Los casos graves se manifiestan por la expulsión de grandes cantidades de sangre, a menudo en forma de coágulos, por la orina. El animal desarrolla una anemia hemorrágica y puede morir tras una enfermedad que dura 1 a 2 semanas (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.2. Signos crónicos

La intoxicación crónica con helecho afecta únicamente a bovinos mayores de 2-3 años. Luego de un prolongado período prodrómico enferman más o menos **en forma grave**. El desarrollo de la enfermedad es insidioso, intermitente con mejorías pasajeras y renovados desmejoramientos, al aumentar la cantidad ingerida de helecho, la intoxicación puede pasar a la forma aguda (Gründer, 2005).

El cuadro clínico resultante es llamado hematuria enzoótica. La condición varía desde una hematuria leve, persistente, como el único signo clínico, hasta casos severos en los cuales hay palidez de las mucosas, estranguria, anemia, disuria y tenesmo. En la orina de los animales muy enfermos pueden ser visibles coágulos sanguíneos (Rebhum, 1995; Giles y Andrews, 2004). Los primeros signos de hematuria pueden ser debido a lesiones microscópicas en las vías urinarias o pueden estar relacionadas con la pancitopenia típica de la toxicidad crónica por ingestión de las hojas de helecho (Rebhum, 1995).

Cuando los bovinos han consumido cantidades comparativamente pequeñas de helecho en períodos prolongados, menos de 10 g/kg de peso

corporal (Marçal, 2003), pueden desarrollarse cambios neoplásicos en el epitelio de transición de la vejiga. Pueden presentarse variados tipos de tumores incluyendo hemangiomas, carcinomas de células de transición, adenocarcinomas y hemangiosarcomas (Giles y Andrews, 2004).

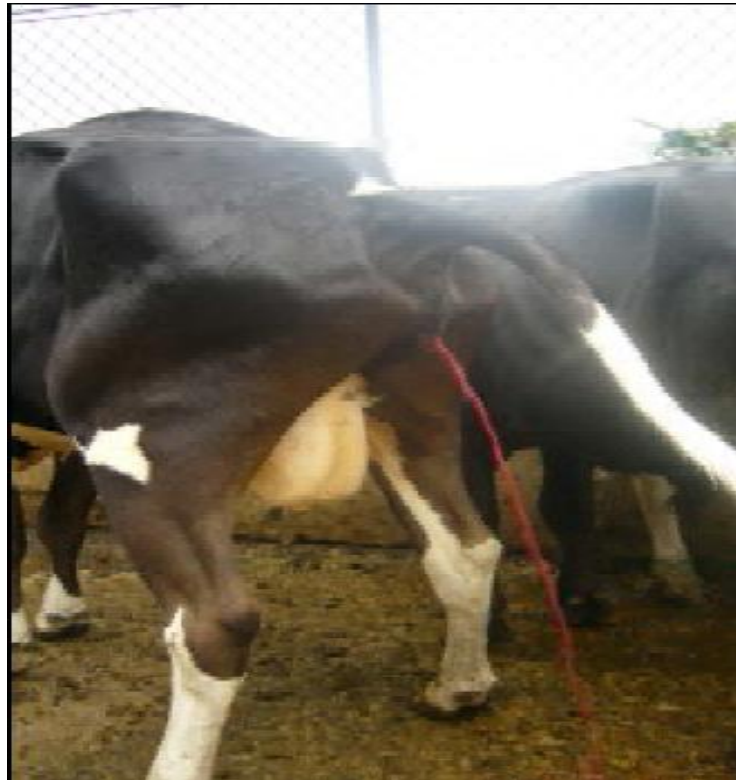


Figura 9. Hematuria

Fuente: Internet

2.5.3. Signos digestivos

Los tumores orofaríngeos producen pérdida de la condición, babeo, tos o ronquidos, halitosis y masas palpables en el esófago. La descarga nasal puede contener ingesta, puede haber linfadenopatía submandibular y diarrea. El timpanismo ruminal puede resultar de los tumores en el esófago inferior; inicialmente hay timpanismo intermitente con pérdida de la condición, luego diarrea y resistencia al pasaje de una sonda esofágica. Los tumores en el rumen dorsal producen pérdida de la condición, diarrea, abdomen distendido y

timpanismo. Los papilomas orofaríngeos frecuentemente pueden acompañar a los tumores en cualquier sitio (Giles y Andrews, 2004).

2.6. Fisiopatología

El helecho es una planta tóxica usualmente acumulativa que actúa de dos maneras. Primero, después de la ingestión de grandes cantidades por unas pocas semanas, los bovinos pueden mostrar un síndrome agudo que resulta de la anemia aplásica y la trombocitopenia. Segundo, la ingestión de cantidades considerables de helecho por varios meses puede conducir a un síndrome crónico llamado hematuria enzoótica (Blowey y Weaver, 2003).

Cuando el ptaquilósido traspasa la barrera fisiológica del estómago e intestino del animal, se incorpora al torrente sanguíneo y de allí se distribuye a todos los tejidos, incluyendo el hígado, riñón y vejiga urinaria, la que resulta particularmente afectada (Alonso-Amelot, 1999). Si el pH de la vejiga es alcalino, la porción glucosa del ptaquilósido se pierde y el ptaquilósido se convierte en un intermediario a glucona dienona (ptaquilosina), que contiene un anillo ciclopropil altamente reactivo capaz de reaccionar con las macromoléculas celulares. La dienona es la sustancia que posee capacidad carcinogénica (Somvanshi *et al.*, 2006).

La dienona posee una gran afinidad por las proteínas con terminales aminos expuestos, incluyendo el ADN, lo que produce alternaciones genéticas e inhibiendo la proteína P53, encargada de regular la apoptosis (Alonso-Amelot, 1999). Por consiguiente, mediante reacciones electrofílicas, la dienona puede formar pterosina B o aductos con bases de ADN (Marin *et al.*, 2004), el ADN puede ser alcalinizado y se puede originar una reparación mal emparejada de este ADN que permite la inducción de proto-oncogenes como el *H-ras*. Se ha sugerido que la dienona reacciona con el ADN, sobre todo con la adenosina, e inicia así la carcinogénesis (Radostits *et al.*, 2002; Roder, 2002).

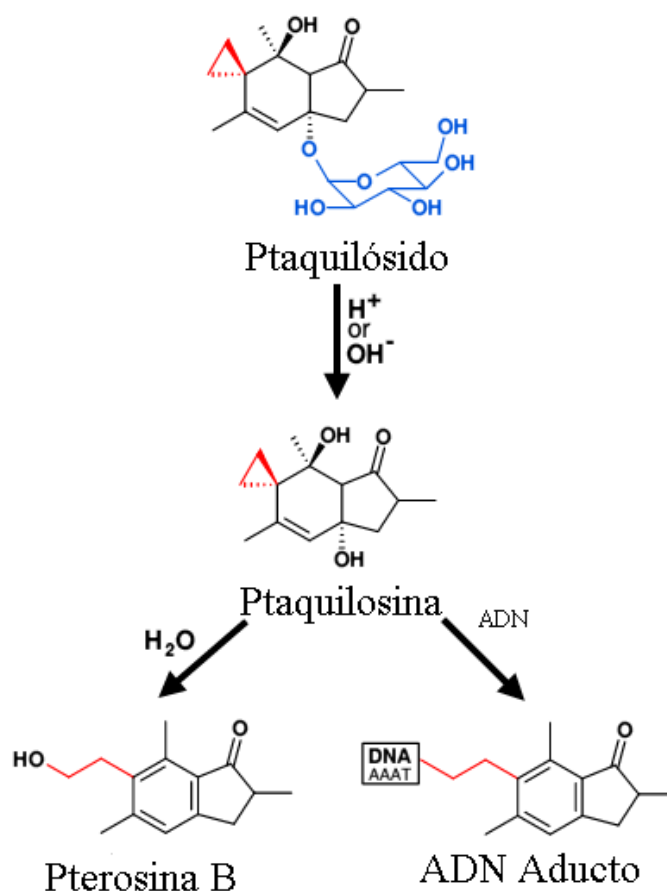


Figura 10. Reacciones sufridas por el ptaquilósido en medios alcalinos
Fuente: Rasmussen (2003).

Grant y Newman (2007) sugieren que la ingestión de helecho actúa como un co-carcinógeno en la progresión del papiloma benigno de la mucosa vesical hacia un carcinoma invasivo de células escamosas. Por otra parte, las hemorragias son el resultado de la trombocitopenia y del incremento de sustancias anticoagulantes circulantes. La neutropenia puede ser seguida por infecciones secundarias que pueden promover la fiebre alta (Carlyle y Duncan, 1990). Finalmente, la muerte se debe a la anemia hemorrágica (Radostits *et al.*, 2002) o es el resultado de una insuficiencia cardiaca (Giles y Andrews, 2004).

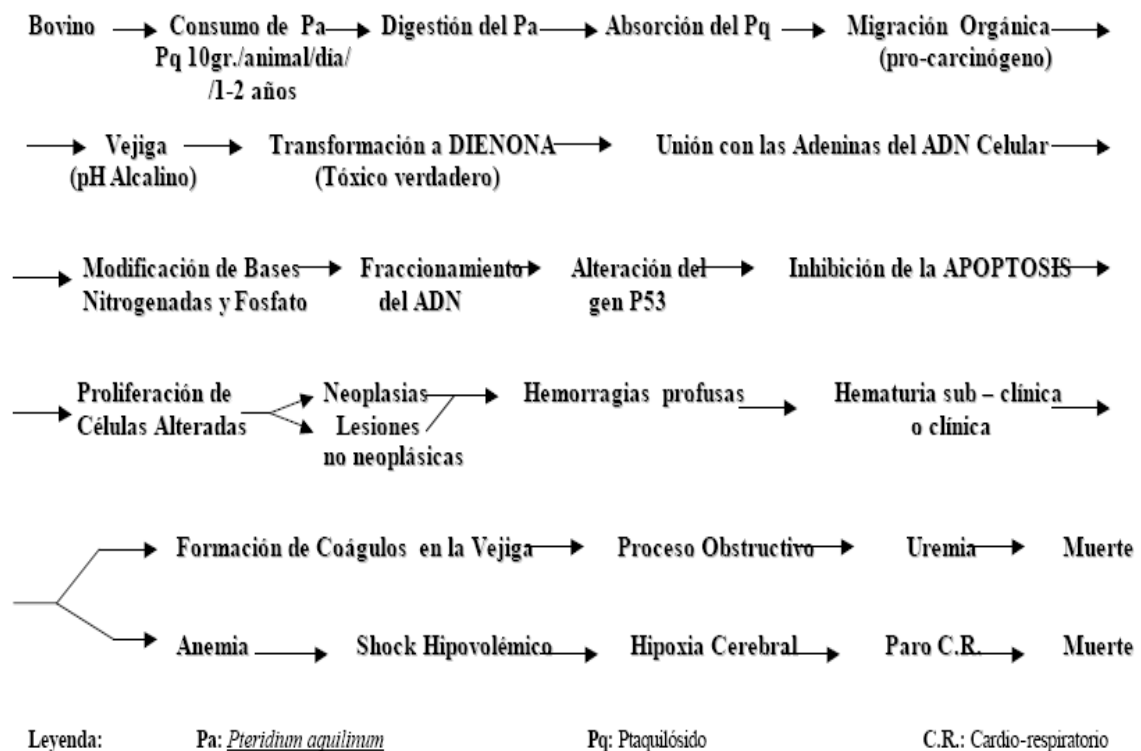


Figura 11. Esquema de la fisiopatología de la HVEB

Fuente: Gonzáles (2003).

2.7. Lesiones

2.7.1. Lesiones macroscópicas

A la necropsia, todos los tejidos están pálidos y el animal suele estar emaciado. La vejiga urinaria contiene coágulos sanguíneos u orina teñida de sangre. El hallazgo de hemangiomas en la submucosa de la vejiga es típico de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002). Las lesiones pueden incluir petequias y equimosis ampliamente distribuidas, especialmente sobre el corazón, riñones y otras superficies serosas, sobre las mucosas, músculos y tejido subcutáneo. Las equimosis abomasales en los bovinos pueden derivar en ulceraciones estomacales e intestinales (Carlyle y Duncan, 1990; Lorgue *et al.*, 1997; Roder, 2002).

En vacas que han pastado hojas de helechos durante largas temporadas, también ha sido descrita una cistitis no infecciosa progresiva con metaplasia tisular de la mucosa de la vejiga urinaria (Rebhum, 1995; Bidault, 2009). En la vejiga urinaria también se encuentran focos hemorrágicos puntiformes hasta pequeñas superficies rojas a negras; en casos avanzados también hay proliferaciones de la mucosa del tamaño de arvejas hasta el aspecto de coliflor (Gründer, 2005).



Figura 12. Múltiples nodulaciones de 2.0 cm. de diámetro y hemorragia difusa

Fuente: Gonzáles (2003)

Los bovinos alimentados con helecho pueden desarrollar hematuria microscópica seguida por hematuria macroscópica. La microhematuria usualmente está asociada con hemorragias petequiales, equimóticas o afluentes en el urotelio de los cálices renales, pelvis, uréter y vejiga. Estas lesiones parecen ser una manifestación del síndrome hemorrágico característico del envenenamiento agudo (Grant y Newman, 2007) y se presentan como inflamación hemorrágica e hiperplásicas crónica pero violenta, que deriva en franca neoplasia (Carlyle y Duncan, 1990).

2.7.2. Lesiones microscópicas

Los cambios histopatológicos hallados en la vejiga de los animales generalmente son divididos en dos tipos: neoplásicos y no neoplásicos. A su vez, las lesiones no neoplásicas son divididas en cambios inflamatorios, hiperplásicos y metaplásicos (Vargas *et al.*, 2003). La co-existencia de estos dos tipos de lesiones en la misma vejiga no es rara (Prasad e Iyer, 1986, Vargas *et al.*, 2003).

En algunos casos la hematuria microscópica ocurre antes que las lesiones macroscópicas sean visibles. Cuando este es el caso, histológicamente se ven áreas difusas o parchadas de decoloración rosácea que se desarrollan en la mucosa de la vejiga y están presentes ectasia y obstrucción por congestión de los capilares. Estos vasos alterados son propensos a la hemorragia en la pared o lumen vesical y suelen desarrollarse lesiones hemangiomatosas nodulares en las áreas afectadas (Grant y Newman, 2007).

La histología muestra que las hemorragias se originan en las dilataciones capilares (ectasias capilares endoteliales, cavernización angiomatosa con tendencia a degeneración sarcomatosa), luego hay proliferaciones epiteliales más o menos vascularizadas de aspecto papilar o papilomatoso. Estas últimas tienden a la infiltración carcinogénica maligna de toda la pared vesical, pero sólo excepcionalmente hacen metástasis en los nódulos linfáticos pelvianos o en otros órganos (Gründer, 2005).

En las alteraciones neoplásicas microscópicas de la vejiga se observan lesiones inflamatorias de la mucosa, infiltrados linfocitarios, congestión, edema y hemorragia. Puede encontrarse hiperplasia del epitelio transicional de revestimiento. Estas células hiperplásicas pueden transformarse en papilomas o en masas sólidas que muestran transformación glandular (Prasad e Iyer, 1986). En algunos casos se encuentran lesiones en los uréteres y la pelvis renal (Radostits *et al.*, 2002). También se observa hipoplasia severa o aplasia de los tejidos hematopoyéticos (Carlyle y Duncan, 1990).

2.7.3. Tumores de la vejiga urinaria

Los tumores son raros en bovinos que viven fuera de las áreas endémicas de HVEB y muy infrecuentes cuando el hebrecho no es consumido. Así, la prevalencia tumoral vesical ha sido reportada en bovinos desde 0.1% hasta 0.01% (Pamukcu, 1974). En esta enfermedad se desarrollan varios tipos de neoplasias que incluyen tumores de origen tanto epitelial como mesenquimal. Las metástasis son posibles en algunos casos (Rebhum, 1995).

Ocasionalmente los tumores también se desarrollan en la pelvis renal y uréter, y los hemangiomas hepáticos han sido vistos en algunos animales. La mayoría de las neoplasias están localizados en las paredes ventral y lateral de la vejiga, donde es proporcionado un contacto constante con la orina (Grant y Newman, 2007).

Respecto al desarrollo tumoral, se presentan varios tipos de neoplasias epiteliales y mesenquimales, incluyendo los carcinomas de células transicionales y escamosas, papilomas, adenomas, hemangiosarcomas, hemangiomas, leiomiosarcomas, fibromas y fibrosarcomas (Vargas *et al.*, 2003). Las neoplasias epiteliales parecen desarrollar de los cambios hiperplásicos y metaplásicos (escamosos y mucosos) en el urotelio (epitelio vesical) que frecuentemente acompañan las lesiones vasculares ya descritas. También pueden estar presentes múltiples tumores de más de un tipo y en casi 50% de los bovinos afectados se desarrollan neoplasias mixtos epiteliales-mesenquimales. Los tipos malignos pueden invadir las zonas circundantes y casi el 10% de las neoplasias epiteliales hacen metástasis hacia ganglios regionales o pulmones (Radostits *et al.*, 2002; Grant y Newman, 2007).

Los papilomas, fibromas, hemangiomas y los carcinomas son los tipos tumorales más comunes (Grant y Newman, 2007). Un estudio que realizó una clasificación histológica de 46 lesiones en vejiga urinaria de bovinos con HVEB encontró carcinomas uroteliales (58.7%), papilomas (15.2%), hemangiosarcomas (8.7%), sarcomas (6.5%) y tumores mixtos de carcinomas uroteliales y hemangiosarcomas (6.5%) (Resendes *et al.*, 2010).

En el trabajo de Ramos (2009) se concluye que las lesiones vesicales inducidas experimentalmente en cobayos alimentados con *Pteridium aquilinum*, la neoplasia epitelial más frecuente fue el carcinoma de células transicionales y entre las neoplasias mesenquimales, el leiomioma y el mixoma fueron las más frecuentes. Además, la mayoría de neoplasias estuvieron acompañadas de cistitis no supurativa.

2.7.3.1. Tumores epiteliales

a. Papiloma

Los papilomas vesicales son tumores papilares que tienen un estroma fibrovascular delicado cubierto con epitelio transicional no distinguible del epitelio vesical normal y de no más de seis células de profundidad. El diagnóstico de papiloma está basado en una ausencia completa de anaplasia celular. En los bovinos, los papilomas conforman aproximadamente el 17% de los casos de tumores primarios vesicales (Pamukcu, 1974; Grant y Newman, 2007).

b. Adenoma

Es un crecimiento benigno del epitelio glandular que ocurre raramente en bovinos. Estos adenomas varían desde solitarios, masas en forma de coliflor hasta crecimientos múltiples, pedunculados. Algunos adenomas no pueden distinguirse de los tumores uroteliales papilares. Los adenomas no invaden las capas musculares de la pared vesical, se desarrollan de las glándulas pre-existentes en la mucosa o del epitelio transicional a través de cambios metaplásicos (Pamukcu, 1974; Hendrick *et al.*, 1998).

c. Carcinoma de células transicionales

Los carcinomas conforman casi el 80% de los tumores epiteliales de la vejiga en bovinos. Los carcinomas de células transicionales son los más comunes. El diagnóstico de neoplasia está basado en la anaplasia celular, invasión o metástasis. La metástasis es un fenómeno tardío en el carcinoma de la vejiga (Figura 10) (Pamukcu, 1974; Pamukcu *et al.*, 1976).

El epitelio transicional sufre proliferación localizada con metaplasia hacia el epitelio escamoso estratificado o columnar y, en algunos casos, una mezcla de ambos tipos (Carlyle y Duncan, 1990). Los carcinomas de células transicionales frecuentemente hacen metástasis hacia los nódulos linfáticos regionales y los pulmones (Pamukcu, 1974). En base a la descripción macroscópica y microscópica, los carcinomas de células transicionales pueden ser divididos en cuatro tipos:

- **Carcinoma no papilar no infiltrativo:** el tumor está confinado a la superficie. Las células tumorales aún están dentro del epitelio de origen sin la invasión de la membrana basal. Estos carcinomas son raramente hallados en bovinos (Pamukcu, 1974; Hendrick *et al.*, 1998).

- **Carcinoma papilar:** crece dentro del lumen de la vejiga y macroscópicamente parece un papiloma, pero su base es más amplia y sus vellosidades son confluentes y romas. El crecimiento puede tener un patrón tipo coliflor sin embargo no invade el estroma de su propio tallo o la base del crecimiento (Pamukcu, 1974; Moreira *et al.*, 2006).

- **Carcinoma papilar e infiltrativo:** parece un carcinoma papilar pero invade el estroma de su propio tallo y la lámina propia de la pared vesical. Este tipo tumoral conforma el 55% de los carcinomas en bovinos (Pamukcu, 1974; Grant y Newman, 2007).

- **Carcinoma infiltrativo:** crece dentro de la pared de la vejiga y usualmente parece una lesión plana, tipo placa, o un parche ulcerado, infiltrado

en la mucosa sobre un crecimiento nodular (Pamukcu, 1974; Hendrick *et al.*, 1998).

d. Carcinoma de células escamosas

El carcinoma de células escamosas usualmente no es papilar, aunque muchas veces puede tener focos papilares. Los tumores bien diferenciados pueden ser distinguidos del carcinoma de células transicionales porque hay una franca queratinización. Los carcinomas de células escamosas frecuentemente resultan de la epidermidización de un tumor papilar o de células transicionales. Este tipo de tumores no es raro en animales y conforma aproximadamente el 7% de los carcinomas de vejiga. Estos carcinomas hacen metástasis fácilmente (Pamukcu, 1974; Prasad e Iyer, 1986; Grant y Newman, 2007, Vargas *et al.*, 2003).

e. Adenocarcinoma

Pueden segregar mucina y se originan del epitelio metaplásico. Esta metaplasia puede asociarse a la toxicidad. Los adenocarcinomas son de origen disontogénico, se ubican a lo largo de toda la vejiga y no provienen de una metaplasia glandular de la mucosa vesical, **mientras** que los que poseen esta metaplasia no son considerados verdaderos adenocarcinomas (Carlyle y Duncan, 1990; Hendrick *et al.*, 1998).

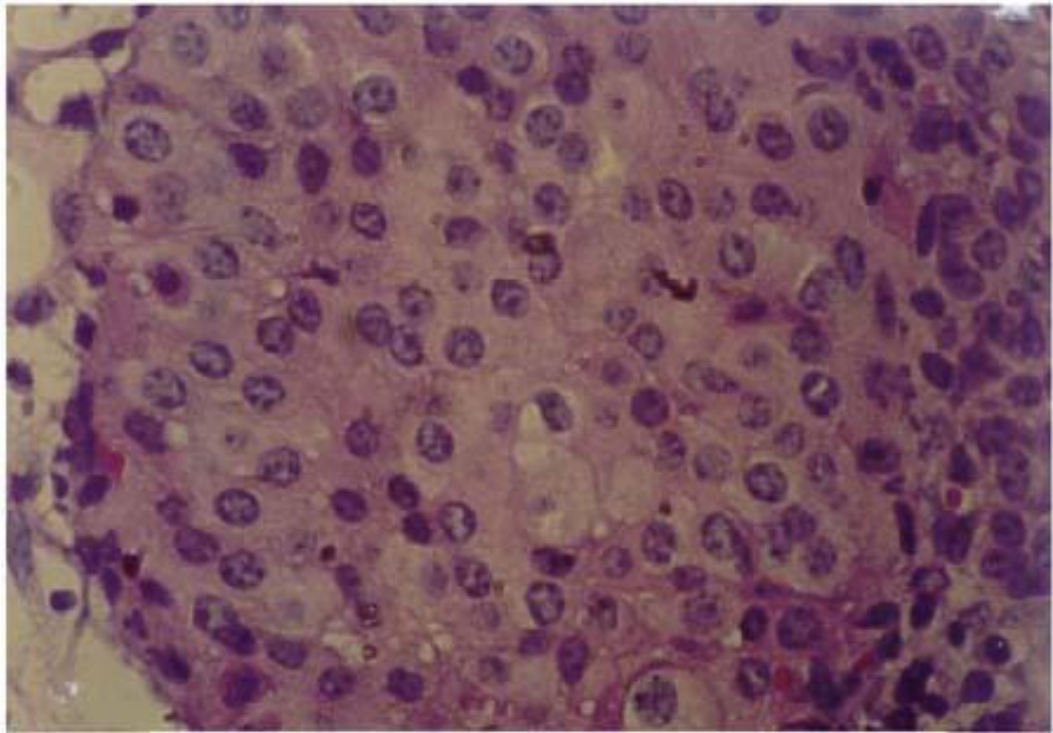


Figura 13. Carcinoma de células transicionales

Fuente: Gonzáles (2003).

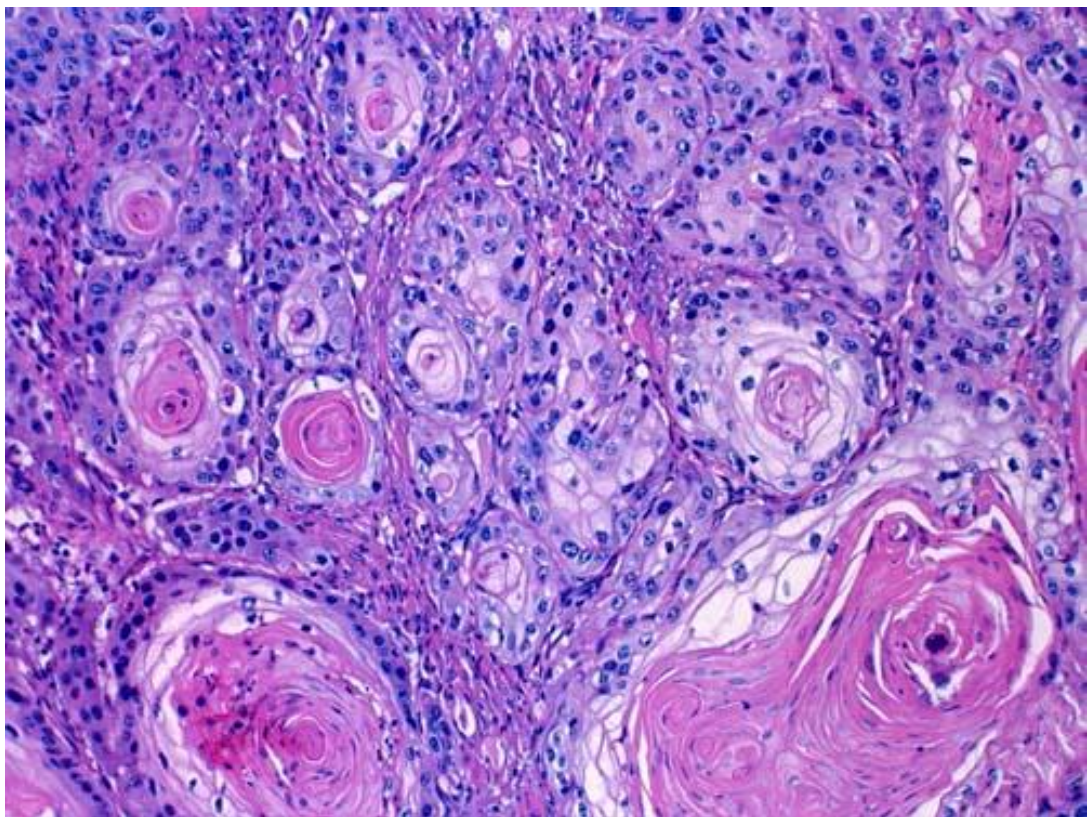


Figura 14. Carcinoma de células escamosas

Fuente: González (2003).

f. Carcinoma indiferenciado

Como algunos tumores, es imposible reconocer el tipo celular de origen. Este término indiferenciado se refiere al tipo de epitelio y no al grado de anaplasia (Pamukcu, 1974; Moreira *et al.*, 2006).

2.7.3.2. Tumores no epiteliales

Los tumores vesicales no epiteliales comprenden el 18% de todos los tumores primarios en bovinos. La mayoría de tumores no epiteliales en bovinos son de tipo vascular (Pamukcu, 1974; Pamukcu *et al.*, 1976).

a. Tumores musculares

El leiomioma y el leiomiosarcoma surgen de la capa muscular lisa de la vejiga, o pueden ser un crecimiento mesenquimal indiferenciado, que se diferencia dentro del músculo. Los leiomiosarcomas son musculares y consisten de células acidofílicas alargadas, pleomórficas, con marcada celularidad, células gigantes y con figuras mitóticas que la diferencian del leiomioma. Su presentación es rara en casos de HVEB (Hendrick *et al.*, 1998).

Los rhabdomiosarcomas son tumores raros en cualquier localización. Macroscópicamente se proyectan como masas botroides que infiltran la pared vesical y pueden hacer metástasis, pero usualmente se identifican por la obstrucción urinaria que causan antes que la infiltración ocurra. Microscópicamente son una mezcla de células fusiformes y pleomórficas con células multinucleadas (Grant y Newman, 2007).

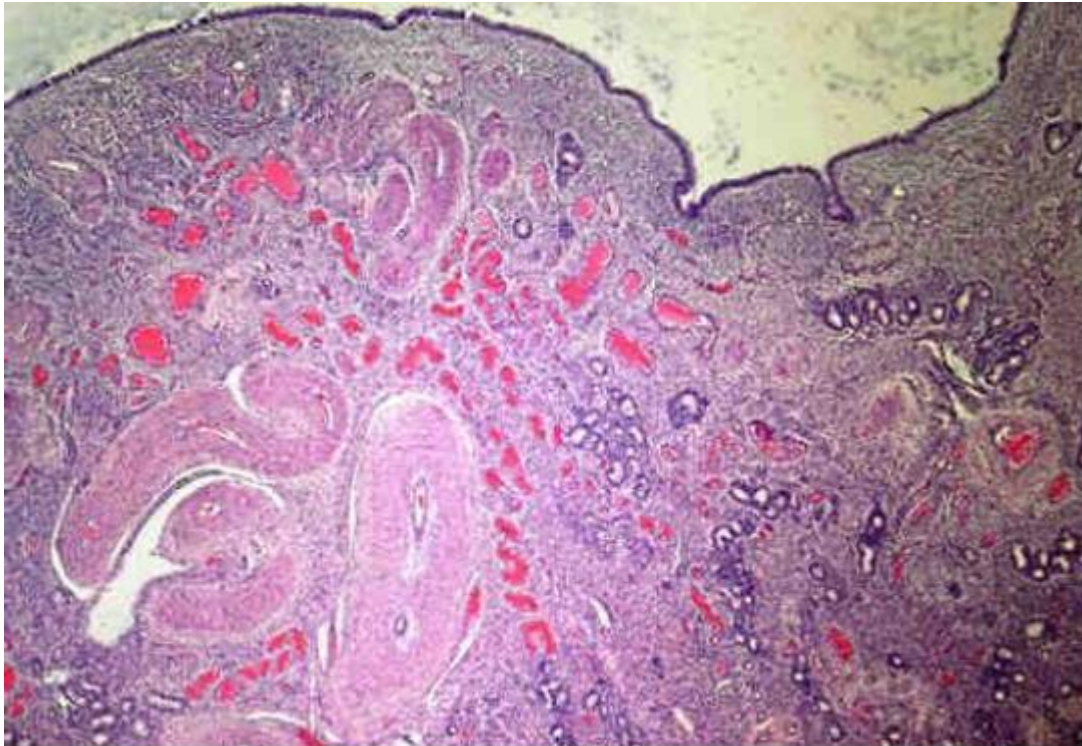


Figura 15. Leiomiosarcoma en HVEB

Fuente: Internet

b. Tumores vasculares

Pueden ser vistas numerosas masas discretas proyectándose desde la superficie mucosa de la vejiga. Estas masas sangran fácilmente según la vejiga se distiende y contrae. Los hemangiomas pueden desarrollar hasta tumores ulcerantes de variados tipos (Blowey y Weaver, 2003).

Se han reportado hemangiomas, hemangiosarcomas y hemangiopericitomas. Los hemangiomas los que se presentan en mayor proporción. El hemangioma consiste en espacios vasculares dilatados, llenos de sangre, delimitados por una pared de células endoteliales ligeramente engrosadas, con márgenes demarcados pero no encapsulados. Puede haber trombosis vascular, generalmente en el tipo cavernoso. El hemangiosarcoma está compuesto de células endoteliales inmaduras, que generalmente forman espacios vasculares. Estas células neoplásicas varían en forma y tamaño, pero usualmente son alargadas, con núcleos redondos u ovoides, hipercromáticos y

con figuras de mitosis. Similar al hemangioma, puede haber trombosis, así como pequeñas grietas o canales cavernosos. Por otro lado, el hemangiopericitoma está compuesto de células neoplásicas, que forman láminas concéntricas no solo alrededor de los vasos sanguíneos, sino también alrededor de los paquetes de colágeno y fibroblastos (Hendrick *et al.*, 1998).

c. Tumores fibroblásticos

Entre ellos tenemos a los fibromas, fibrosarcomas y sarcomas. Su presentación en vacunos con HVEB, se da en porcentajes bastante bajos (Pamukcu *et al.*, 1976; Hendrick *et al.*, 1998).

d. Otros tumores

Aquí se clasifican a los linfomas, cuya presentación es infrecuente en vacunos con HVEB (Hendrick *et al.*, 1998).

2.7.3.3. Tumores epiteliales-mesenquimales

Son aquellas que poseen al mismo tiempo neoplasias tanto de origen epitelial como de origen mesenquimal, lo cual es muy frecuente encontrar en animales que padecen HVEB (Pamukcu, 1974; Prasad e Iyer, 1986).

2.7.3.4. Tumores secundarios

Se originan de la implicancia secundaria de la vejiga ya sea por extensión de tumores malignos primarios desde órganos adyacentes, o por la implantación de lesiones primarias localizadas en el tracto urinario superior o muy raramente por metástasis de órganos distantes (Pamukcu, 1974; Moreira *et al.*, 2006).

2.7.3.5. Tumores no clasificados

Estos son tumores primarios benignos o malignos que no pueden ser colocados en ninguna de las categorías descritas anteriormente (Pamukcu, 1974).

2.7.3.6. Cambios proliferativos

Los cambios proliferativos vesicales usualmente se originan de la cistitis. Estos cambios pueden ser confundidos macroscópicamente con tumores, pero la diferenciación histológica no causa ninguna dificultad (Pamukcu, 1974; Prasad e Iyer, 1986). Los cambios proliferativos observados generalmente son:

- a. **Nidos de Von Brunn:** son grupos compactos de células epiteliales transicionales que yacen en la lámina propia, con o sin conexión hacia el epitelio superficial (Pamukcu, 1974). Son lesiones de tipo hiperplásico y de proliferación en la submucosa, a veces con cistitis quística y metaplasia glandular. Los nidos de Von Brunn son las lesiones más habituales y se observan como agregados celulares redondos y compactos en la lámina propia de transición (Grant y Newman, 2007; Bidault, 2009).
- b. **Metaplasia glandular:** está caracterizada por células epiteliales columnares que contienen moco, ya sea sobre la superficie o formando glándulas en la lámina propia (Pamukcu, 1974; Hendrick *et al.*, 1998).
- c. **Metaplasia escamosa:** el epitelio transicional muestra metaplasia escamosa y es reemplazado por células escamosas con o sin queratinización. Usualmente hay hiperplasia del epitelio (Pamukcu, 1974).
- d. **Cistitis quística:** son grupos de células epiteliales transicionales con cavitación central, algunas veces quísticas, que yacen en la lámina propia, con o sin conexión al epitelio superficial (Pamukcu, 1974 Grant y Newman, 2007).

- e. ***Cistitis polipoide***: está caracterizada por epitelio hiperplásico que cubre proyecciones engrosadas, como dedos, de la lámina propia. Las proyecciones son edematosas, hiperémicas y están infiltradas con células inflamatorias (Pamukcu, 1974; Pamukcu *et al.*, 1976).

2.7.4. Lesiones en el tracto digestivo superior

Un tercer síndrome clínico menos común que resulta de la exposición prolongada al helecho es el carcinoma de células escamosas del tracto digestivo superior, que puede acompañar los cambios o la formación tumoral en la pared vesical. La enfermedad tiene una fuerte incidencia regional. Cuatro síndromes clínicos son reconocidos dependiendo del sitio de formación tumoral (Giles y Andrews, 2004). Una examinación de lesiones tumorales en bovinos halló carcinomas presentes en el 100% de las vejigas urinarias y en el 50% de los esófagos de los casos confirmados de HVEB (Marrero *et al.*, 2001).

En el estudio de Marin *et al.* (2004) los animales presentaron tumores en esófago desde el extremo oral al cardial, solitarios o múltiples, pedunculados, de aspecto rugoso, laminados y pesados proyectándose desde la mucosa y con variado tamaño.

2.8. Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo está basado en los signos clínicos y una asociación con alimentación con helecho o de la prolongada exposición al helecho. Se hallan varios animales enfermos al mismo tiempo. En los casos agudos o subagudos, la depresión de la médula ósea resulta en trombocitopenia y leucopenia, prolongado tiempo de sangrado y de formación de coágulos y anemia (Rebhum, 1995; Blowey y Weaver, 2003; Giles y Andrews, 2004). El diagnóstico exacto de la enfermedad requiere una examinación invasiva como la biopsia, con los consiguientes inconvenientes para el animal y su propietario (Hoque *et al.*, 2002).

2.8.1. Examinación y signos clínicos

La examinación de la vejiga es relativamente sencilla en los bovinos mediante palpación rectal. Frecuentemente cuando está vacía yace completamente dentro de la pelvis, pero cuando está distendida yace dentro de la cavidad peritoneal anterior al borde pélvico y es fácilmente palpable como una estructura tensa redonda (Jackson y Cockcroft, 2002).

La examinación clínica del animal afectado revela ausencia de fiebre en la mayor parte de los casos y la examinación rectal permite la palpación de múltiples masas dentro de la pared vesical (Divers, 2008) o un engrosamiento de la misma (Rebhum, 1995). En las hembras los pelos de la comisura inferior de la vulva y en machos los pelos prepuciales están pegados por la sangre (Gründer, 2005).

2.8.2. Hematología

El análisis hematológico puede detectar una anemia inespecífica en la HVEB (Radostits *et al.*, 2002). Las modificaciones del hemograma consisten en la disminución de eritrocitos y hemoglobina en el sentido de una anemia normocrómica además, hay una trombopenia y leucopenia leve a moderada con recuento diferencial normal de los leucocitos. No se comprueban trastornos de coagulación (Marín *et al.*, 2004; Gründer, 2005).

El cuadro hematológico consta de leucopenia intensa con agranulocitosis y trombopenia/trombocitopenia, neutropenia, anemia y la médula muestra aplasia de la serie granulocítica y trombocítica (Carlyle y Duncan, 1990; Lorgue *et al.*, 1997). La investigación realizada por Mengi *et al.* (2001) (Cuadro 3) reveló valores promedio de hemoglobina, hematocrito, hemoglobina corpuscular, concentración promedio de hemoglobina corpuscular y conteo eritrocítico total significativamente inferiores en vacas con hematuria respecto a bovinos control saludables. Sin embargo, no se hallaron cambios en el valor del volumen corpuscular medio, lo que indica que se desarrolla una anemia normocítica

hipocrómica. Por otra parte, en un estudio similar, Sánchez *et al.* (2004) no apreciaron ningún cambio significativo en el valor de la concentración promedio de hemoglobina corpuscular sugiriendo que los animales tenían anemia microcítica.

Cuadro 3. Valores hematológicos, bioquímicos y minerales plasmáticos de vacas con hematuria vesical enzoótica bovina y bovinos control saludables.

Parámetros	Vacas con HVEB	Bovinos control
Hemoglobina (g/dl)	7.67 ± 0.13	11.07 ± 0.24
Hematocrito (%)	26.50 ± 0.43	34.02 ± 0.90
TEC (x10 ⁶ /mm)	5.21 ± 0.09	6.56 ± 0.19
MCV (fl)	51.05 ± 0.57	51.98 ± 0.89
MCH (Pg)	14.86 ± 0.29	16.95 ± 0.47
MCHC (%)	28.35 ± 0.77	32.62 ± 0.77
Proteínas plasmáticas totales (g/dl)	5.99 ± 0.12	7.02 ± 0.19
Nitrógeno úrico plasmático (mg/dl)	29.86 ± 0.56	18.38 ± 0.99
Creatinina plasmática (mg/dl)	1.89 ± 0.04	1.50 ± 0.04
Calcio (mg/dl)	8.30 ± 0.18	9.49 ± 0.14
Fósforo inorgánico (mg/dl)	7.17 ± 0.16	4.99 ± 0.19
Magnesio (mg/dl)	2.23 ± 0.14	2.15 ± 0.08
Cobre (µg/dl)	97.78 ± 4.33	84.58 ± 7.17
Molibdeno (ppm)	2.02 ± 0.12	1.93 ± 0.21

TEC = Conteo eritrocítico total

MCV = Volumen corpuscular medio

MCH = Hemoglobina corpuscular media

MCHC = Concentración de hemoglobina corpuscular media

Fuente: Mengi *et al.* (2001).

La anemia puede ser debida a la pérdida de hierro que resulta de la pérdida sanguínea crónica y la neutropenia es por la temprana destrucción de las células mieloides. Los megacariocitos desaparecen (Carlyle y Duncan, 1990). Los resultados que se observan en los diversos trabajos indican que el animal

afectado por la HVEB tiene una eritropoyesis deficiente, donde los eritrocitos son mayormente microcíticos y en algunos casos se observa hipocromía leve (Sánchez *et al.*, 2004).

2.8.3. Urianálisis

El análisis de orina o urianálisis es una de las pruebas más importantes para detectar enfermedades de las vías urinarias. Este análisis incluye pruebas físicas y químicas como la evaluación del color de la orina, turbidez, pH, etc., y la evaluación microscópica del sedimento urinario, que es una técnica importante para la detección de hematuria (Braun y Lefebvre, 2008).

Una valoración inicial de la orina puede ser hecha utilizando las tiras reactivas que pueden indicar la presencia cualitativa de sangre, hemoglobina, cetonas o pigmentos biliares. También puede **obtenerse** un indicio de la cantidad de proteína presente en la orina. Glóbulos rojos y blancos pueden ser detectados por microscopía directa. Hay un sedimento celular presente en la hematuria pero no en la hemoglobinuria a pesar de que la orina tiene matices rojizos en ambos casos (Jackson y Cockcroft, 2002).

En el análisis de orina se puede revelar proteinuria en estrecha relación con la hipoproteinemia e hipoalbuminemia. También hay un aumento del nitrógeno ureico y baja gravedad específica urinaria, indicativo de disfunción renal. En el sedimento urinario hay un aumento de las células procedentes de la vejiga urinaria o también llamadas células transicionales (Cuadro 4) (Sánchez *et al.*, 2004).

La macrohematuria es aparente a la inspección, mientras que la hematuria oculta o microhematuria es detectada por una reacción positiva con la prueba de la ortotoluidina mediante tiras reactivas. Este reactivo ortotoluidina no puede diferenciar entre hematuria, hemoglobinuria o mioglobinuria y las tres deben ser consideradas a menos que el color, precipitación de los glóbulos rojos o el urianálisis completo indique el componente exacto (Divers, 2008).

Cuadro 4. Características de la orina de bovinos y algunas observaciones

Características	Observación
Cantidad	Aproximadamente 6 a 12 litros por día. Los bovinos producen aproximadamente 1 ml de orina por kilogramo de peso corporal por hora.
Color	Normalmente dorado y claro. La decoloración roja puede indicar la presencia de glóbulos rojos (hematuria) o hemoglobina (hemoglobinuria). Una decoloración marrón o amarilla puede indicar la presencia de mioglobina o pigmentos, respectivamente. La orina puede parecer turbia si contiene pus o sangre.
Olor	Fétido si está infectado o retenido. El olor de las cetonas puede ser detectado en los animales cetónicos.
Gravedad específica	1.020 a 1.045.
pH	7 a 8. La alcalinidad se puede incrementar por la urotiliasis. La orina puede ser ácida en algunas infecciones.
Viscosidad	La orina normal fluye libremente con una baja viscosidad. La viscosidad se incrementa en la orina concentrada y en la presencia de pus y sangre.
Proteína	Si hay daño glomerular o amiloidosis se presenta un alto contenido de proteína.
Glucosa	Se presenta raramente en la orina, pero ocasionalmente se detecta después de procesos de estrés. También puede ser vista en la rara condición para los bovinos, diabetes mellitus.
Porfirinas	Se observan si hay una anomalía eritropoyética congénita.

Fuente: Jackson y Cockcroft, 2002.

En la microhematuria sólo se encuentra microscópicamente un número aumentado de eritrocitos en el sedimento; en la macrohematuria la orina presenta sangre a simple vista. En los casos leves solamente contiene sangre la última porción de la micción, en los graves toda la orina está roja y turbia, incluso contiene coágulos de sangre (Gründer, 2005). Si no hay hematuria macroscópica, se centrifuga una muestra de orina y se analiza el sedimento para buscar eritrocitos. Puede ser necesario repetir la prueba varias veces (Radostits *et al.*, 2002).

La microhematuria podría originarse desde el riñón (por ejemplo, por infarto, nefrosis tubular, pielonefritis u otras causas), uréteres (por ejemplo por cálculos, tumores o pielonefritis), vejiga (por cistitis, cálculos o tumores), uretra o a través de la contaminación sanguínea de la orina en la vagina. La macrohematuria usualmente es asociada con la pielonefritis, cálculos urinarios, urolitiasis o cistitis en bovinos lecheros (Divers, 2008).



Figura 16. Análisis microscópico del sedimento urinario

Fuente: Internet

Cuadro 5. Análisis de orina y su relación con la HVEB

Parámetro	Vacas saludables	Vacas con HVEB
Proteínas (g/L)	< 0.3	> 1.0 (↑)
Leucocitos (cél/L)	< 15	> 70 (↑)
Densidad (g/cc)	1.025 ± 0.008	1.002 ± 0.003 (↓)
Sangre oculta (cél/L)	< 0.3	> 60 (↑)
Nitritos	Negativo	Positivo (↑)
Sedimento	Negativo	Abundantes eritrocitos, leucocitos y bacterias; células transicionales (>12/c)

Fuente: Sánchez *et al.* (2004)

2.8.4. Bioquímica clínica

Se ha visto disminución de la concentración sérica de tiamina, disminución de la actividad transcetolasa del eritrocito, elevadas concentraciones de piruvato sérico y elevadas concentraciones de lactato sérico (Roder, 2002). También se han reportado diferencias significativas para los parámetros AST, ALT, fosfatasa alcalina, BUN, creatinina, potasio, calcio, fósforo y cloro, sin hallar diferencias en magnesio y sodio. Los valores BUN de las vacas afectadas se pueden encontrar ligeramente elevados (Sánchez *et al.*, 2004).

El Cuadro 3 también muestra una significativa disminución en las proteínas totales en las vacas con HVEB en comparación a los animales saludables. Esto podría ser debido a la pérdida sanguínea crónica y la filtración de proteínas, particularmente albúmina, a través de los riñones (Mengi *et al.*, 2001).

Sánchez *et al.* (2004) encontraron hipoproteinemia e hipoalbulinemia en animales con HVEB, lo que sugeriría una posible disfunción hepática. Otras causas de lo anterior podrían ser también la pérdida debido a disfunción renal o la pérdida de sangre por las lesiones vesicales.

También hay una disminución de las actividades de la β -glucuronidasa y la fosfatasa alcalina. La proteína urinaria y la creatinina se incrementan. Respecto a los valores plasmáticos, sólo la actividad de la lactato deshidrogenasa se incrementa. Para la lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina puede permitir el diagnóstico precoz de la HVEB, lo que no permite el análisis sanguíneo (Bidault, 2009).

2.8.5. Cistoscopia

En casos dudosos el diagnóstico puede confirmarse por cistoscopia utilizando un endoscopio especial llamado cistoscopio. En esta prueba se observan preferentemente en el triángulo vesical focos hemorrágicos del tamaño de una cabeza de alfiler desde los cuales fluye sangre hacia el lago urinario, incluso pueden observarse pólipos del tamaño de arvejas, avellanas o papas color oscuro o rojo negruzco (Gründer, 2005).

2.8.6. Ecografía

Hace unos pocos años, la introducción de la ecografía ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades que involucran las estructuras de tejido suave de la cavidad abdominal. La vejiga urinaria, en especial, es un órgano ideal para la ecografía, es fácilmente reconocida en condiciones normales y de enfermedad. Además, la ecografía está completamente desarrollada en la **Medicina Humana** y la **Medicina Veterinaria** de animales menores (Hoque *et al.*, 2002). La vejiga y su contenido pueden ser evaluados fácilmente mediante una ecografía rectal y algunas veces transabdominal. En las hembras, el revestimiento de la vejiga también puede ser observado utilizando un endoscopio pediátrico pasado a través de la uretra (Jackson y Cockcroft, 2002).

El trabajo realizado por Hoque *et al.* (2002) halló que la vejiga urinaria fue muy fácilmente reconocida como una estructura vesicular anecoica distendida con la orina y la resolución de las imágenes fue buena. El procedimiento fue

ejecutado sin ninguna molestia para los animales y tomó un promedio de 5 minutos por animal.

Sandoval *et al.* (2002) estudiaron por ecografía, vía transrectal, la vejiga urinaria de seis vacas con diagnóstico previo de hematuria enzoótica bovina y de dos vacas control sanas. La obtención de las imágenes se logró mediante la utilización de un transductor lineal con frecuencias de 5.0 y 7.5 MHz en modo B. En las vacas con hematuria, se observaron imágenes ecográficas compatibles con patologías, que se clasificaron en dos tipos. Las lesiones de tipo 1 fueron papilares pedunculadas originadas en la pared vesical y que sobresalían hacia el lumen; las lesiones de tipo 2, fueron aquellas de carácter erosivo con pérdida de la continuidad de la mucosa de la pared vesical rodeadas con zonas hipoecoicas y anecoicas. Las lesiones tipo 1, fueron clasificadas de acuerdo su tamaño en tres grados (I,II y III) o rangos, midiendo los bordes a nivel de su origen. Las lesiones más frecuentemente encontradas fueron las del tipo 2, que se apreciaron en el 100% de las vacas con diagnóstico previo de hematuria y las lesiones del tipo 1 Grado II con un 27,8%. Las evidencias sugirieron que en un mismo animal problema se pueden encontrar diferentes tipos y grados de lesiones, las cuales no fueron encontradas en las vacas control. Además, los hallazgos ecográficos fueron considerados compatibles con las lesiones anatomopatológicas post-mortem asociadas a la hematuria enzoótica bovina. El estudio demuestra la utilidad de la evaluación ecográfica, especialmente para el diagnóstico temprano y pronóstico de la enfermedad.

2.8.7. Necropsia

La necropsia es una técnica utilizada para determinar la causa de muerte o el problema que sufría un animal. Para obtener la máxima información de este análisis post-mortem de un animal, es necesario seguir un procedimiento rutinario riguroso que permita la visualización de todos los sistemas. De este modo se asegura la descripción de todas las lesiones posibles (Höfle, 2001).

2.8.8. Histopatología

La confirmación del diagnóstico se basa en los signos desarrollados por los animales que pastan en campos llenos de helechos y **preferentemente** por las lesiones histopatológicas encontradas en la vejiga utilizando un microscopio óptico (Radostits *et al.*, 2002). **Completar información de técnica histológica.**

Por otra parte, Vargas *et al.* (2003) utilizaron muestras preparadas de bloques de parafina o secciones tisulares recientemente preparados teñidas con hematoxilina-eosina. En algunos casos se utilizaron coloraciones especiales como PAS o el tricrómico de Masson para observar tejido conectivo.

2.8.9. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica avanzada que utiliza anticuerpos seleccionados para identificar antígenos específicos. Estos anticuerpos por lo general están unidos a un elemento que produce color. Es una prueba muy sensible que puede detectar cantidades relativamente pequeñas de una sustancia en particular (Sardon *et al.*, 2005).

La inmunohistoquímica se ha utilizado para la detección de uroplaquinas, **que** son productos de diferenciación de las células uroteliales que forman una proporción principal de la membrana unitaria asimétrica y son expresadas más consistentemente en el epitelio superficial de transición. **Se notó disminución** en la tinción inmunohistoquímica positiva de uroplacina en los tumores uroteliales crecientemente malignos en bovinos con hematuria enzoótica crónica. Aunque no es necesario el uso de tumores para dictar un pronóstico, la tinción de uroplaquinas puede asistir en la identificación de grupos celulares uroteliales metastáticos y caracterizar adicionalmente la diferenciación de células transicionales en las neoplasias (Grant y Newman, 2007).

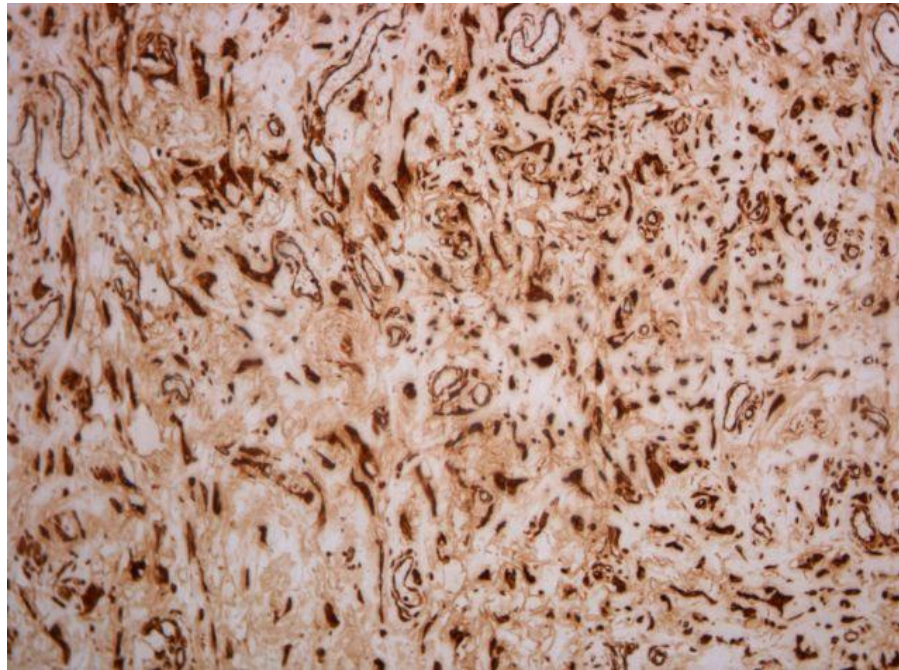


Figura 17. Técnica inmunohistoquímica utilizando anti-vimentina

Fuente: Internet

La expresión de uroplaquinas fue investigada en 20 tumores vesicales de vacas que habían estado sufriendo de HVEB por varios años. En el urotelio displásico y las proliferaciones papilomatosas, la expresión de las uroplaquinas fue evidente tanto en la tinción luminal como en la intracelular. Las uroplaquinas aparecieron claramente definidas en la membrana plasmática de las células luminales y los límites de las células colocadas en las capas más profundas. Esta expresión es similar a los patrones de uroplaquinas de algunos tumores uroteliales en humanos (Ambrosio *et al.*, 2001).

Algunos estudios en tumores humanos indican que las neoplasias uroteliales expresan ambas formas de la enzima ciclooxigenasa (COX). El trabajo de Borzacchiello *et al.* (2003) identificó por inmunotinción el gen de la COX-2 intracitoplasmáticamente en urotelio normal y en 17 de 20 muestras neoplásicas de bovinos. Se sabe que los genes COX-1 y COX-2 están involucrados en la carcinogénesis de tumores uroteliales de humanos y de algunos animales. Hubo una expresión moderada a intensa del COX-2 en los carcinomas uroteliales no invasivos e invasivos, lo que indica que el COX-2 es

sobre-expresado en los carcinomas uroteliales que se presentan naturalmente en bovinos, y que esta inmunotinción puede tener un valor diagnóstico.

También se ha estudiado la expresión inmunohistoquímica del gen H-ras en lesiones vesicales de bovinos adultos expuestos a hebrecho. Al analizar 46 lesiones macroscópicas vesicales de HVEB, hubo una expresión inmunohistoquímica significativamente incrementada de H-ras en la cistitis crónica (53.24%) y los tumores vesicales (63.60%) en comparación a las vejigas urinarias de animales normales (4.32%). Por lo tanto, la inmunohistoquímica del H-ras puede ser de valor para identificar animales en etapas tempranas e incluso tardías, de la enfermedad (Sardon *et al.*, 2005).

2.8.10. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica es una técnica de gran utilidad, en especial para fines diagnósticos y de investigación de las relaciones entre los agentes patógenos y el hospedero. Por lo general se utiliza en microbiología para observar la estructura de los virus, y en patología para realizar diagnósticos partiendo de la ultraestructura celular (Jurado y Petruccelli, 2005). Sánchez *et al.* (1999a) realizaron un estudio ultraestructural de la vejiga de bovinos con HVEB. Las muestras se dividieron en partes de 1 mm de grosor que incluyeron áreas afectadas y áreas normales. La tinción utilizada fue azul de toluidina al 1% y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo. La observación se realizó a un aumento de 360x.. **Completar la ultraestructura celular de neoplasia.**

2.8.11. Otros análisis diagnósticos

El análisis citogenético de bovinos con HVEB demostró un mayor número de anomalías estructurales cromosomales que en animales control sin

acceso al helecho común. Igualmente, por este análisis se puede observar el efecto clastogénico en neoplasias vesicales (Lioi *et al.*, 2004).

2.9. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial se hace principalmente con cistitis y pielonefritis. Ambas alteraciones suelen ir acompañadas de fiebre, polaquiuria y presencia de pus y restos sólidos en la orina. El estudio bacteriológico de la orina revela la presencia de infección (Radostits *et al.*, 2002).

También hay que incluir en el diagnóstico diferencial algunos síndromes agudos como ántrax y pasteurelosis septicémica, el síndrome de prurito pirexia hemorrágicas, anemia hemolítica, las micotoxicosis y casos crónicos de hematuria deben diferenciarse de infecciones como la babesiosis, leptospirosis, la hemoglobinuria post-parto (Blowey y Weaver, 2003; Giles y Andrews, 2004) y heridas de vejiga o uretra (Gründer, 2005). La anaplasmosis puede diferenciarse por el hallazgo de un bazo de gran tamaño y del organismo causal en los eritrocitos. La leptospira produce hemorragias y fiebre, sin embargo las hemorragias no suelen tener mucha importancia. La diferencia se hace por la presencia de ictericia (Carlyle y Duncan, 1990). Por otro lado, los síndromes causados por los carcinomas de células escamosas del tracto digestivo superior se parecen a la enfermedad de **Johnes**, deficiencia de cobre y enfermedad de las mucosas (Giles y Andrews, 2004).

En el diagnóstico diferencial también debe tenerse en cuenta la intoxicación por trébol dulce, aunque las hemorragias son muy grandes, hay formación de hematomas en los tejidos y no suele haber fiebre. En este caso, las transfusiones sanguíneas curan al animal rápidamente. En la intoxicación por crotalaria las hemorragias no muestran diferencias con la HVEB pero el hígado suele presentar considerable fibrosis, la vesícula biliar está distendida y con frecuencia hay edema abomasal y duodenal. En la intoxicación por harina de

soya extraída por tricloroetileno el cuadro presenta anemia y hemorragias. La diferenciación dependerá principalmente de la anamnesis. En ninguna de estas intoxicaciones hay neutropenia como en la intoxicación por helecho (Carlyle y Duncan, 1990).

2.10. Tratamiento

No debe intentarse ningún tratamiento y los animales afectados deben ser sacrificados en la primera oportunidad (Radostits *et al.*, 2002). El tratamiento de los casos individuales usualmente no es esperanzador. No hay manejo terapéutico exitoso de la neoplasia en la vejiga urinaria o el tracto digestivo superior (Giles y Andrews, 2004). El primer paso suele ser el retiro inmediato de la comida o pastos que contienen helecho (Gründer, 2005).

En los casos agudos son necesarias transfusiones sanguíneas, estas suelen ser de más de 4 litros de sangre por animal, mientras que en los demás casos debe administrarse una mezcla hematínica (Radostits *et al.*, 2002; Roder, 2002; Blowey y Weaver, 2003). La transfusión de sangre es el tratamiento más eficaz: para bovinos adultos 1 a 4 litros, conteniendo citrato de sodio al 3%; 100 ml por 400 ml de sangre. Se puede utilizar también azul de toluidina: 1 g/litro de suero salino, IV de 1 a 2 litros en 24 horas; alcohol butílico (2 g), Tween 80 (5 g), cloruro de sodio al 1%, 100 ml en infusión IV lenta, 20 a 50 ml al día (Lorgue *et al.*, 1997).

Los antibióticos de amplio espectro deben ser administrados para contraatacar la bacteriemia e infecciones secundarias (Giles y Andrews, 2004). También se pueden utilizar antihistamínicos (Lorgue *et al.*, 1997).

Ha sido descrito el uso de estimulantes de la médula ósea incluyendo DL-batil alcohol de manera parenteral (Giles y Andrews, 2004), pero no se considera como un tratamiento efectivo (Roder, 2002). También se han realizado lavados repetidos de vejiga, luego de una pequeña anestesia extradural sacra a temperatura corporal (Gründer, 2005).

2.11. Pronóstico

En la hematuria vesical crónica es desfavorable. Su grado clínico depende de la intensidad y la duración de la hemorragia. Si se continúa con la alimentación con helecho el estado de los animales desmejora paulatinamente, incluso bastante rápido (Gründer, 2005). En los casos agudos el resultado clínico probablemente está más influenciado por el grado de daño a la médula ósea que por el tratamiento (Giles y Andrews, 2004). Los indicadores de una depresión grave de la médula ósea (recuento de leucocitos de $< 2.000/\text{mm}^3$ o plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$) sugieren un mal pronóstico (Roder, 2002).

Una alimentación correcta sin helecho logra una mejoría paulatina pero no una curación total. Estos animales pueden alcanzar una edad avanzada pero ya no son rentables. Si se repite la ingesta de helecho, reaparece la hematuria. En los machos existe el peligro de que los coágulos causen obstrucción temporal o permanente de la uretra (Gründer, 2005).

2.12. Prevención y Control

A pesar de su extensa abundancia en ciertas áreas, el helecho siempre debe ser visto como una planta potencialmente tóxica para los bovinos. Debe realizarse un arado profundo, el control agresivo del pasto o utilizar herbicidas para controlar el crecimiento del helecho. El acceso a las pasturas infestadas con helecho siempre debe ser limitado, especialmente si el crecimiento del pasto es pobre. En particular, nunca se debe permitir a los bovinos tener acceso a la tierra recién arada con helecho presente y donde los rizomas están expuestos, especialmente si ellos comienzan a retoñar (Rebhum, 1995; Roder, 2002; Giles y Andrews, 2004). Se puede realizar un control químico bianual con la aplicación del herbicida metsulfurón metil (Sánchez *et al.*, 2003).

Un mejoramiento general de la nutrición suele hacer que disminuya el número de animales afectados. Una recomendación específica consiste en aplicar sulfato de calcio hidratado (225-335 kg/hectárea) al pasto como fertilizante, medida que parece retrasar la presentación de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002). Un buen ensilaje con $\leq 10\%$ de helecho parece ser inocuo para los bovinos (Gründer, 2005).

La erradicación del helecho común es difícil y no debe intentarse sin asesoramiento para el control de malas hierbas (Radostits *et al.*, 2002). Las áreas limitadas de infestación por helecho pueden ser cercadas, quemadas, aradas y resembradas o pueden utilizarse herbicidas para el control. Todas estas medidas sirven para reducir el nivel de contaminación por helecho (Blowey y Weaver, 2003; Giles y Andrews, 2004).

2.13. Importancia de la HVEB en la salud pública

La leche ha sido reconocida como una fuente potencial de productos naturales tóxicos por muchos años. Además de las micotoxinas adquiridas por el animal por medio de los mohos presentes en el alimento formulado, otros variados metabolitos secundarios de carácter xenobiótico han sido detectados en la leche de animales expuestos a un amplio rango de plantas (Alonso-Amelot *et al.*, 1998).

Para que un componente dietético aparezca en la leche, primero tiene que ser incorporado en el torrente sanguíneo y luego transferido a través de las membranas de la célula mamaria hacia la leche (Alonso-Amelot *et al.*, 1998). En 19 de 20 bovinos con HVEB, se han detectados dos componentes tóxicos del helecho común: la quercetina y el ptaquilósido, en orina, suero y leche (Lioi *et al.*, 2004).

El experimento realizado por Alonso-Amelot *et al.* (1998) consistió en la alimentación de seis vacas con 6 kg/animal/día de hojas frescas del helecho *Pteridium aquilinum* cuyo contenido de ptaquilósido fue determinado

previamente. El ptaquilósido apareció en la leche 38 horas después de la alimentación inicial con esta planta y continuó siendo excretado a un nivel relativamente constante, después de un período de inducción, por 62 a 70 horas después del cese de la dieta. El valor promedio de ptaquilósido excretado fue aproximadamente 8.6% del ptaquilósido total ingerido. Esta sustancial cantidad de ptaquilósido hallado en la leche debe ser de especial interés, especialmente para los granjeros que consumen leche de los hatos alimentados en áreas infestadas con helecho.

Se ha considerado la posibilidad que por consumo directo o indirecto de *Pteridium*, sean transmitidas sustancias carcinógenas por medio de la leche o carne al ser humano, causando un incremento en el riesgo de adquirir neoplasias de las vías digestivas superiores (Marín *et al.*, 2004). Villalobos (1985) estudió la correlación entre el consumo de leche potencialmente contaminada con los factores carcinogénicos de *P. aquilinum* y la alta incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica. Este trabajo comprobó la contaminación de leche y la presencia de *P. aquilinum* en los establos de bovinos con HVEB y concluyó que la leche debe ser considerada un posible factor etiológico en el cáncer gástrico en humanos.

2.14. Avances en el diagnóstico de la hematuria vesical enzoótica bovina en el país

En nuestro país se han realizado muy pocos estudios con relación a la hematuria vesical enzoótica bovina a pesar de su importancia e implicaciones que esta enfermedad tiene en la sanidad animal, desarrollo pecuario y recientemente, en la salud pública. Los criadores de bovinos de la zona de Oxapampa (Pasco) (ver Fig. 15) han comenzado a hablar de la HVEB desde aproximadamente 1970 y no tenían la certeza de que la enfermedad fuera producida por el helecho común. Lo que si se sabía era que la enfermedad genera muchas pérdidas económicas y que los tratamientos no eran efectivos. Igualmente se ha realizado una encuesta en Oxapampa donde todos los

ganaderos han expresado que tienen HVEB en su ganado (Verde, comunicación personal).

La provincia de Oxapampa está ubicada en el departamento de Pasco, en la margen derecha del río Chontabamba, a una altura de 1814 msnm y con una superficie de 982 km²; tiene un clima húmedo semi-cálido con temperaturas entre 18 - 23°C y una precipitación pluvial de 1800 mm (MINAG, 2010). La población aproximada de bovinos en la provincia de Oxapampa es de 60,000 cabezas de ganado, con una producción de tipo extensiva, poco tecnificada y de doble propósito. El pastoreo se realiza en áreas extensas, donde predominan las gramíneas como *Setaria* o Estrella Africana, pero debido a la tendencia al sobre pastoreo y a la sobrecarga animal, hacen su aparición las malezas destacando entre ellas el helecho común o *Pteridium aquilinum*, de gran distribución en la provincia, sobre todo en los distritos encima de los 800 msnm. (Gonzáles, 2003).

Por otra parte, se está realizando una investigación sobre la relación entre cáncer gástrico y el consumo de leche de bovinos con HVEB. En el Hospital General de Oxapampa hay una alta incidencia de este tipo de cáncer en la población local (Gonzáles, comunicación personal).

En nuestro país, los primeros reportes realizados sobre esta enfermedad son de Gonzáles y Carpio (1973) en Pucallpa; López (1983) en el valle de Oxapampa; y Velarde (1991) en los valles del Huallaga, departamento de San Martín y el valle de Pichis Palcazu en Pasco. Sin embargo, en la última década se ha puesto énfasis en la investigación de esta enfermedad como de sus diversos aspectos, entre ellos el diagnóstico.

González (2003) realizó una caracterización anátomo-patológica de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria en la zona de Oxapampa, departamento de Pasco. De 173 bovinos de diferentes edades, razas y procedencia, 41 (23.7%) resultaron lesiones compatibles con HVEB. Veinte muestras procedentes de animales de Oxapampa (48.78%), 9 de Chontabamba (21.95%), 6 de Huancabamba (14.63%), 3 de animales de

Palcazu (7.32%), 2 de Pozuzo (4.88%) y una muestra fue de un animal de Puerto Bermúdez (2.44%) (Figura 15).



Figura 18. Porcentaje de casos registrados de HVEB en la provincia de Oxapampa

Fuente: Adaptado de González (2003).

Además, realizó una evaluación macroscópica de estas lesiones vesicales y se tomaron muestras para el procesamiento histopatológico. Se utilizaron la tinción hematoxilina-eosina y coloraciones histoquímicas realizando las técnicas de Hale para mucopolisacáridos y la tinción tricrómico de Masson para tejido conectivo y muscular, con presencia de colágeno. Esta caracterización anátomo-patológica ha permitido determinar los procesos proliferativos tales como la proliferación polipoide, quística e hiperplásicas; procesos circulatorios como extravasaciones, dilatación vascular o nidos de neoformaciones vasculares (llamados por el autor “nidos angioblásticos”); procesos inflamatorios como cistitis no supurativa o ulceración de la mucosa; y procesos neoplásicos, los cuales se pudieron clasificar de acuerdo al tipo celular afectado, en neoplasias epiteliales, no epiteliales o mesenquimales y neoplasias mixtas. Los cuadros 6 y 7 describen en detalle las lesiones halladas en las muestras vesicales analizadas. Este trabajo ha logrado demostrar científicamente la presencia de HVEB en el país y la presencia de los nidos angioblásticos.

Cuadro 6. Extensión y tipo de lesiones vesicales halladas en bovinos de Oxapampa con HVEB (2003)

Extensión de la Lesión	N° de Casos	Frecuencia (%)
Focal	6	14.63
Multifocal	35	85.37
Total	41	100.00

Tipo de Lesión	N° de Casos	Frecuencia (%)
Formaciones nodulares fijadas a la mucosa	34	82.93
Formaciones verrucoides	17	41.46
Mucosa enrojecida	24	58.54
Extravasación vascular	27	65.85
Pared vesical engrosada	24	58.54
Degeneración de la mucosa	10	24.39
Macro - nodulaciones pediceladas	2	4.88
Masas gelatinosas rojo oscuro en el lumen	3	7.32

Cuadro 7. Tipos de lesiones tumorales vesicales halladas en bovinos de Oxapampa con HVEB (2003)

Neoplasias Epiteliales	N° de casos	Frecuencia (%)	Neoplasias No - Epiteliales	N° de casos	Frecuencia (%)
Carcinoma transicional	4	9.76	Hemangioma	10	24.39
Carcinoma in situ	11	26.83	Hemangiosarcoma	14	34.15
Carcinoma papilar	3	7.32	Hemangiopericitosarcoma	1	2.44
Carcinoma escamoso	1	2.44	Mixosarcoma	6	14.63
Carcinoma tubular	1	2.44	Rabdomiosarcoma	1	2.44
Papiloma mucoso	4	9.76	Leiomiomasarcoma	1	2.44
Papiloma racemoso	1	2.44	Linfoma	1	2.44
-	-	-	Metástasis Linfoide	1	2.44
Total	25	41.70	Total	35	58.30

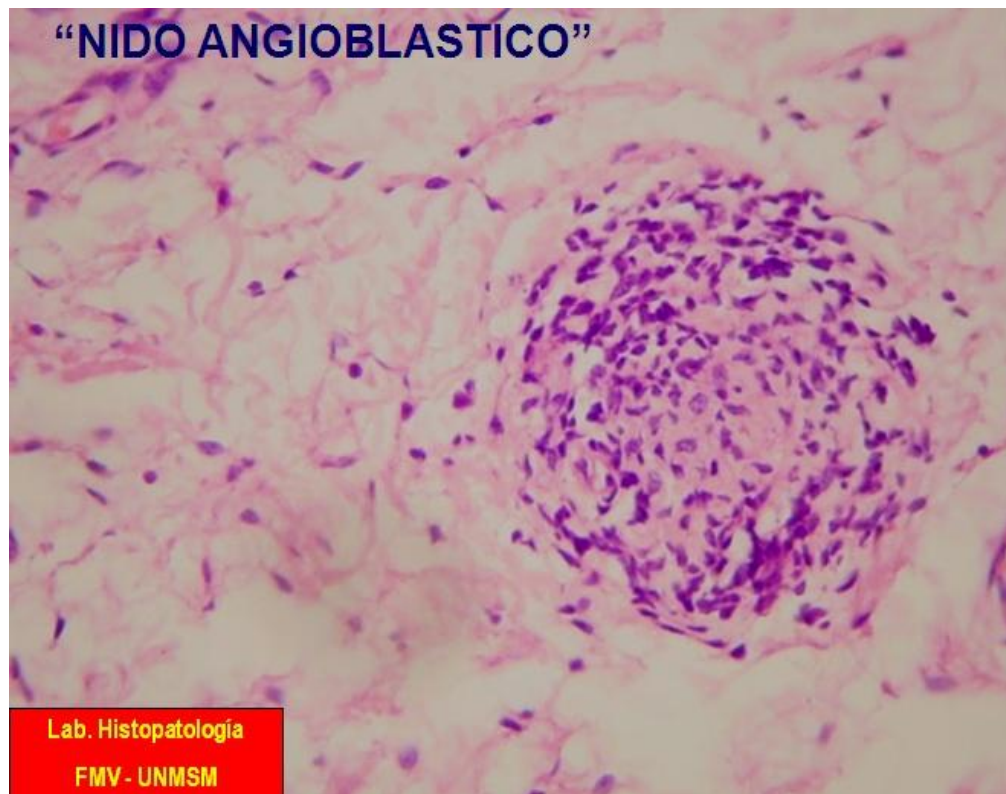


Figura 19. Observación histológica de un nido angioblástico

Fuente: Laboratorio de Histopatología (FMV-UNMSM)

En ese sentido, se logró determinar que la presencia de los procesos neoplásicos proliferativos y los “nidos angioblásticos” viene a ser una indicación de una marcada alteración de los procesos celulares normales, lo cual es una característica patognomónica de esta enfermedad (González *et al.*, 2004).

Por otro lado, Montes (2007) realizó a través de un método de inmunodiagnóstico, la confirmación del diagnóstico de las neoplasias vesicales en bovinos con HVEB, utilizando el método inmunohistoquímico de la estreptavidina-biotina marcada con los anticuerpos comerciales pre-diluidos anti-citoqueratina y anti-vimentina, tomando muestras de tejido del trabajo de Gonzáles (2003). De un total de 28 muestras vesicales de bovinos con procesos neoplásicos, se determinó la presencia de carcinomas in situ, papilomas mucosos, carcinomas transicionales, hemangiosarcomas y hemangiomas. De estas 28 muestras se eligieron 14 que representaran las diferentes hojas blastodérmicas y diferentes grados de diferenciación.

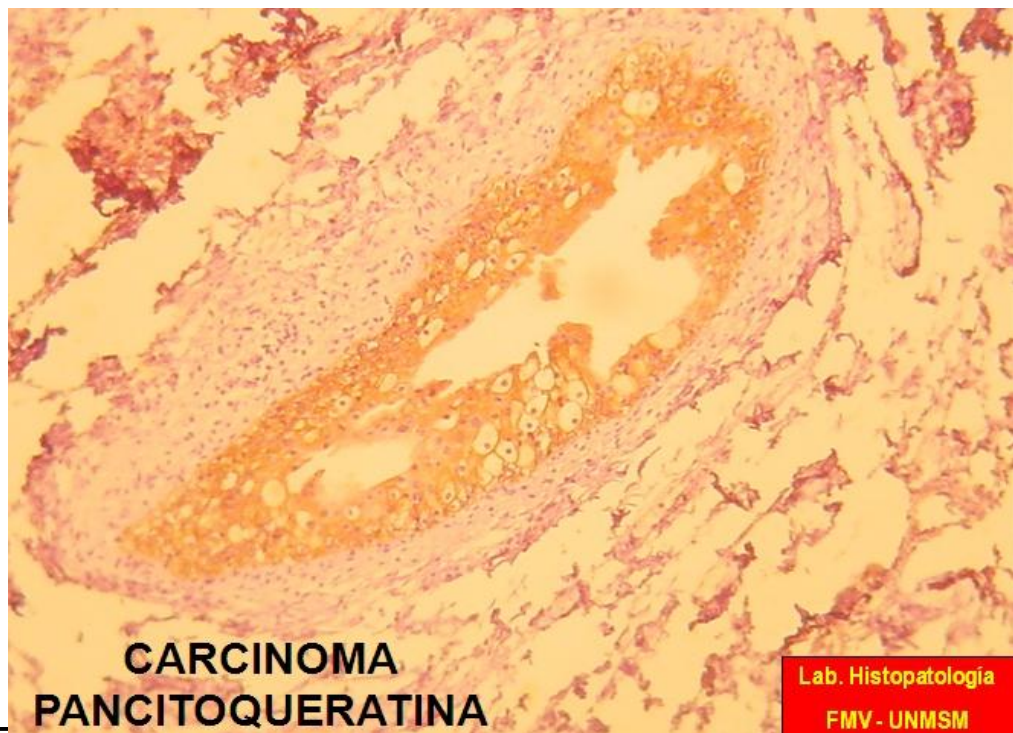


Figura 20. Diagnóstico de carcinoma utilizando inmunohistoquímica

Fuente: Laboratorio de histopatología (FMV-UNMSM)

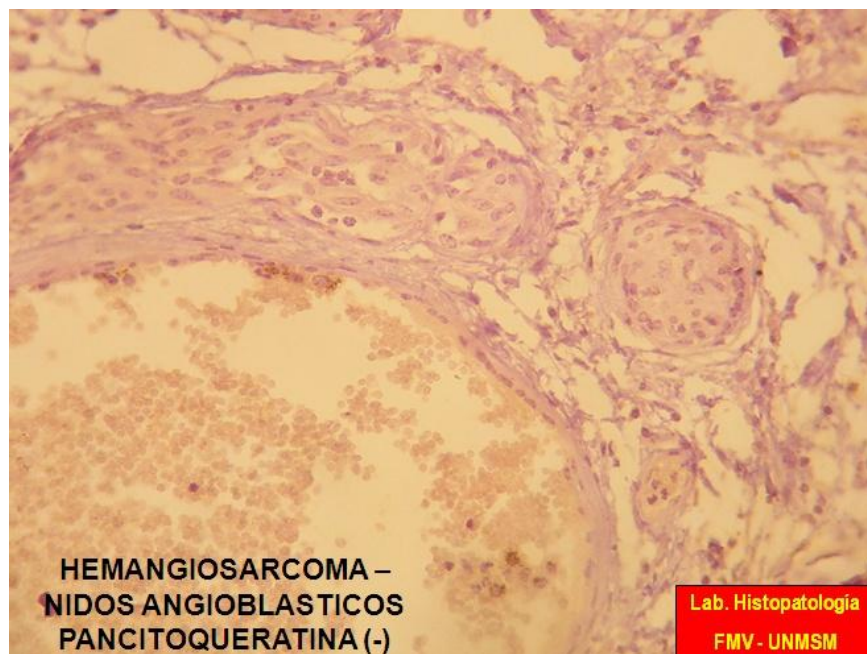


Figura 21. Diagnóstico de hemangiosarcoma y nidos angioblásticos utilizando inmunohistoquímica

Fuente: Laboratorio de histopatología (FMV-UNMSM)

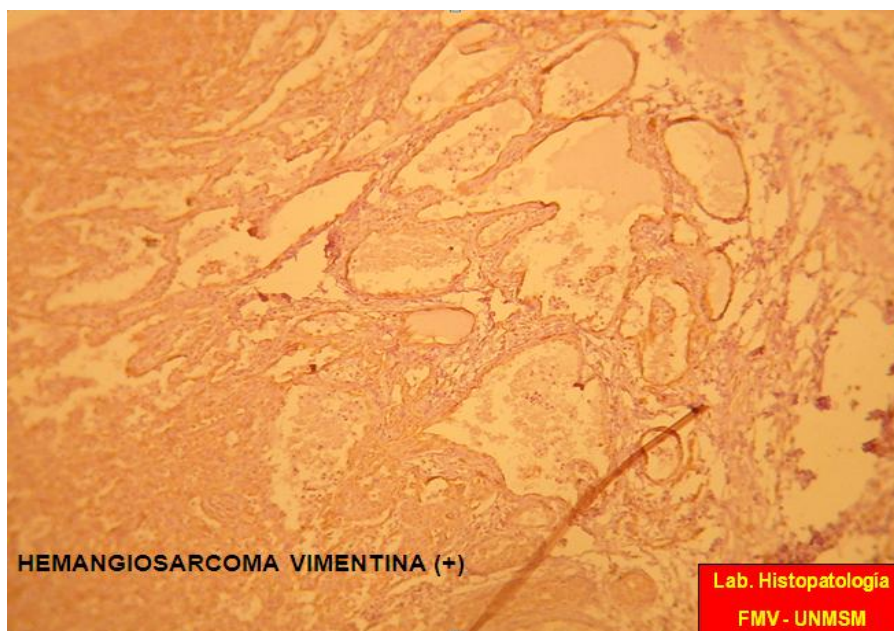


Figura 22. Diagnóstico de hemangiosarcoma utilizando inmunohistoquímica

Fuente: Laboratorio de histopatología (FMV-UNMSM)

El anticuerpo anti-citoqueratina se utilizó para el diagnóstico de neoplasias epiteliales y mixtas, es decir epiteliales-mesenquimales del lado epitelial; y el anticuerpo anti-vimentina para el diagnóstico de neoplasias mixtas, epiteliales-mesenquimales, del lado mesenquimal. El objetivo del trabajo fue corroborar el origen blastodérmico de las células neoplásicas y de los nidos angioblásticos hallados. Esta técnica incluso ha determinado positivamente el origen de las células neoplásicas poco diferenciadas, lo que ayuda a corroborar al 100% el diagnóstico histopatológico de las neoplasias analizadas. Este estudio también determinó el origen mesenquimal de los nidos angioblásticos con el anticuerpo anti-vimentina, demostrando que están formados por células endoteliales malignas en proliferación para la posterior formación de un hemangiosarcoma.

Entre los últimos trabajos realizados, Ramos (2009) utilizó una evaluación macroscópica descriptiva de lesiones experimentales en cuyes alimentados con *Pteridium aquilinum*. Se criaron 12 cobayos hembras con peso promedio

de 400 gramos al inicio del estudio, alimentadas diariamente (en una proporción del 10% del peso de los cobayos) con concentrado conteniendo el 33.3% de *Pteridium aquilinum* y el 66.6% compuesto por la dieta balanceada para cobayos. La cantidad de concentrado administrada diariamente estuvo en una proporción del 10% del peso de los cobayos, durante los 135 días que duró el estudio. Los animales fueron sacrificados dos al azar a los 30, 60, 90, 120 días y finalmente por escasez de alimento cuatro animales fueron sacrificados a los 135 días de iniciado el estudio. Se remitieron muestras de diferentes órganos para proceder a la elaboración de láminas histopatológicas, y finalmente su respectiva descripción anatomopatológica.

Luego de la evaluación macroscópica, se prepararon láminas histopatológicas utilizando una técnica convencional y la tinción eosina-hematoxilina. La lectura de estas láminas fue con un microscopio óptico de luz con objetivos convencionales. Las lesiones desarrolladas por los cobayos fueron neoplásicas, inflamatorias, degenerativas y/o proliferativas. Los principales órganos involucrados en el desarrollo de neoplasias son vejiga, pulmón, intestino, bazo y linfonódulos; siendo el carcinoma de células transicionales y sus variedades, las neoplasias epiteliales más frecuentes halladas en la vejiga, neoplasias no epiteliales tales como leiomioma y mixoma en vejiga, acompañados de procesos inflamatorios como cistitis no supurativa crónica, y procesos vasculares como telangiectasia y edema suburotelial. En pulmón, intestino, bazo y linfonódulos, la neoplasia más frecuente fue el linfoma maligno, algunas veces acompañados de bronconeumonías, enteritis y esplenitis. En los procesos proliferativos se observó hiperplasia racemosa epitelial intestinal e hiperplasia folicular linfóide en intestino, bazo y/o linfonódulos (Figuras 23 a 26). Con esta técnica de descripción microscópica se han podido determinar procesos inflamatorios, procesos degenerativos, procesos de adaptación tisular y procesos de formación neoplásica. Este trabajo demostró que el cuy es un buen modelo animal para el estudio de los bovinos con HVEB.



Figura 23. Vejiga con edema en suburotelio y presencia de petequias en la superficie del urotelio a los 60 días de iniciado el estudio en cobayos.

Fuente: Ramos (2009)

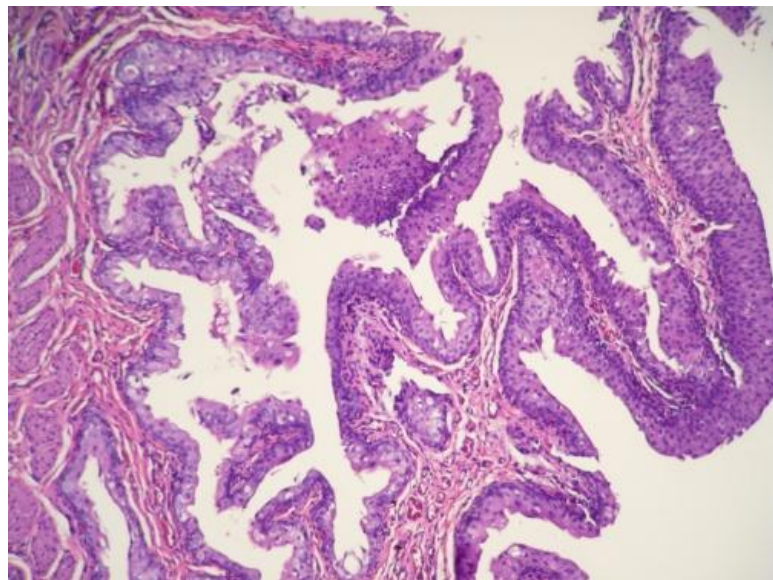


Figura 24. Vejiga con carcinoma de células transicionales infiltrativo y papilar del urotelio a los 60 días de iniciado el estudio en cobayos (Tinción hematoxilina y eosina).

Fuente: Ramos (2009)

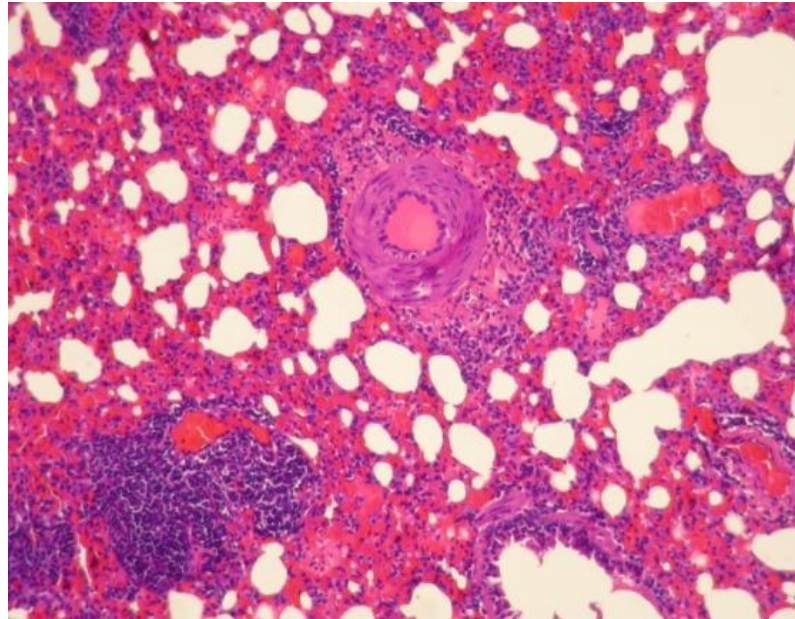


Figura 25. Linfoma pulmonar con múltiples formaciones foliculares compactas de linfocitos atípicos y moderada bronconeumonía mucocataral hemorrágica linfoplasmocítica difusa crónica en cobayos (Aumento 40x).

Fuente: Ramos (2009)

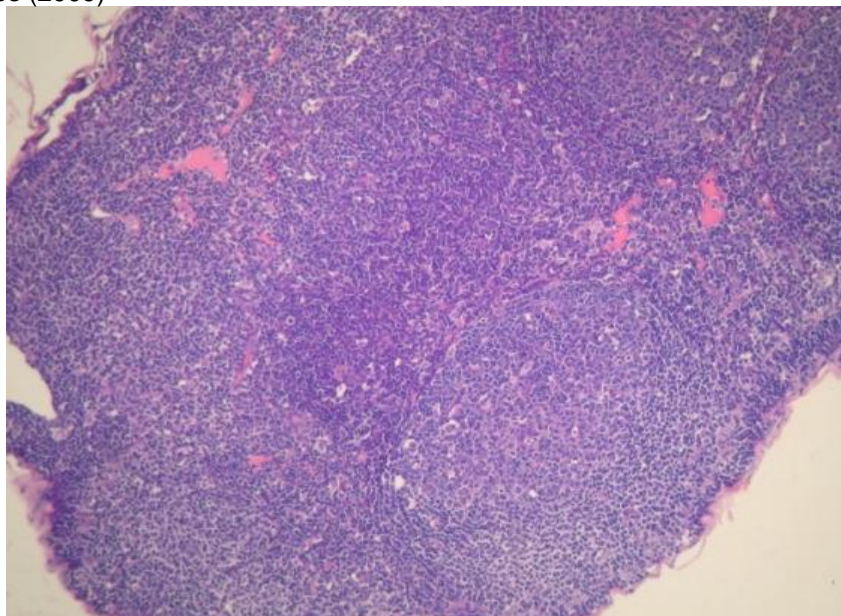


Figura 26. Linfoma maligno linfonodular mesentérico en cobayo. (Tinción hematoxilina y eosina).

Fuente: Ramos (2009)

Paralelamente, Verde (2009) y Herencia (2009) realizaron un diagnóstico clínico de bovinos de Oxapampa con HVEB utilizando el urianálisis y una comparación con tiras reactivas. En el trabajo de Verde (2009) primero se colectaron 221 muestras de la fracción media de orina expulsada mediante masaje manual perivulvar o perineal, previa limpieza de la zona para evitar la contaminación de la muestra. La primera evaluación de la orina se hizo utilizando tiras reactivas para uso humano (SD UroColor™ 11) para determinar sangre, urobilinógeno, proteínas, nitritos, cetonas, ácido ascórbico, bilirrubina, glucosa, pH, gravedad específica y leucocitos. También se hizo una descripción detallada de las características físico-químicas de la orina: color, grado de turbidez, peso específico utilizando un refractómetro y la evaluación del sedimento urinario. Se hizo la comparación con los valores normales reportados en la literatura. De las 221 muestras de orina se hallaron 55 muestras (26.1%) positivas a hematuria mediante la evaluación del sedimento urinario y solamente se hallaron 28 muestras positivas (13.3%) mediante el uso de las tiras reactivas. Las tiras reactivas no pueden dar datos relevantes en la detección de eritrocitos, en cambio, en la evaluación del sedimento si se puede observar directamente la proporción de eritrocitos.



Figura 27. Tiras reactivas para uroanálisis en humanos

Fuente: Internet



Figura 28. Muestra de orina de bovino con HVEB

Fuente: Internet

Asimismo, se realizaron otras determinaciones bioquímicas paralelas con métodos convencionales. Para la determinación de proteínas se utilizó el ácido sulfosalicílico al 3%. La glucosa se determinó con el reactivo de Benedict observando la reacción de color. Para la bilirrubina se utilizó ácido nítrico para la aparición de un anillo de color verde/violeta. También se utilizó lugol para la detectar la formación de un anillo verde esmeralda. Asimismo, se realizó la evaluación microscópica del sedimento luego de la centrifugación de las muestras a 1500 rpm durante 5 minutos, con especial énfasis en el conteo de eritrocitos.

Cuadro 8. Número de eritrocitos observados por campo y relación con el color de orina en el trabajo de Verde (2009).

Grados de la HVEB	Color de la orina				Total
	Amarillo	Amarillo ámbar	Ligeramente rojiza	Rojiza	
Negativo	64	92	0	0	156
Positivo Grado I	11	15	0	0	26
Positivo Grado II	5	7	0	0	12
Positivo Grado III	2	5	1	9	17
Total	82	119	1	9	211

La evaluación microscópica del sedimento se hizo luego de la centrifugación de las muestras. Se realizó el conteo directo de eritrocitos por campo microscópico (promedio de 3-5 campos), considerándose como muestra positiva la presencia de cinco a más eritrocitos por campo. Esta observación permite confirmar los cuadros de hematuria en forma precisa desde sus inicios. Los resultados de la EMS fueron expresados de acuerdo al número de eritrocitos observados por campo: HVEB Grado I = 5-100 eritrocitos/campo, HVEB Grado II = 101-1000 eritrocitos/campo, HVEB Grado III = 1001- campo cubierto. Al final, en este trabajo se concluye que el urianálisis es una herramienta efectiva para el diagnóstico de la HVEB, siempre y cuando incluya la evaluación microscópica del sedimento, y descarta el uso de las tiras reactivas por el bajo nivel de concordancia encontrado entre ambos métodos (Verde, 2009).

En el estudio de Herencia (2009) se evaluaron 210 muestras de orina de bovinos de la provincia de Chontabamba, Oxapampa. Para ello se utilizó la tira reactiva de uso humano Combur Test¹⁰®M, de Roche (USA) y la prueba de

evaluación microscópica de sedimento urinario como la prueba confirmatoria cuantificando igualmente la presencia de eritrocitos. Como en el caso anterior, se hallaron 32 muestras positivas a HVEB (15.2%) con la evaluación del sedimento urinario y 16 muestras positivas (7.6%) con las tiras reactivas. Por lo tanto, se descartó el uso de las tiras reactivas y se recomendó el uso de la evaluación microscópica del sedimento urinario debido a la mayor sensibilidad de la prueba ya que la prevalencia hallada con la evaluación microscópica del sedimento urinario fue 15.2%.

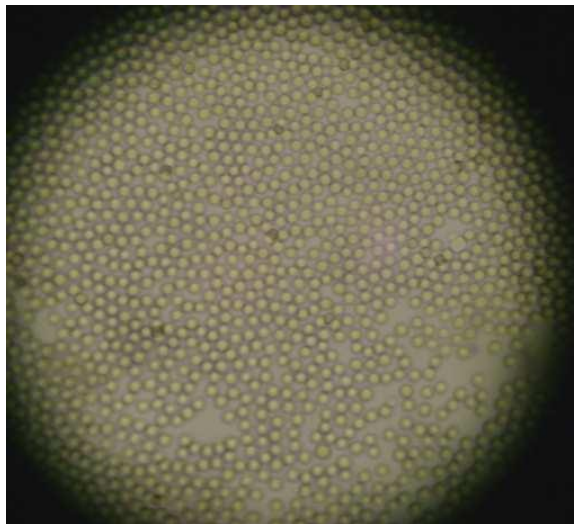


Figura 29. Visualización de eritrocitos en la evaluación microscópica del sedimento urinario

Fuente: Internet

Cuadro 9. Comparación de resultados entre el uso de la Tira Reactiva y la Evaluación Microscópica del Sedimento Urinario en bovinos con HVEB (Herencia, 2009).

Distribución de los resultados de Hematuria Vesical Enzoótica Bovina, a través de la Tira Reactiva Urinaria (TRU) y la Evaluación Microscópica del Sedimento Urinario (EMSU), según edad

Edad (años)	Muestras (n)	Positivos a TRU		Positivos a EMSU	
		n	%	n	%
1.5 a 2	20	3	15.0 ^a	5	25.0 ^a
>2 a 4	66	8	12.1 ^a	17	25.8 ^a
>4	124	5	4.0 ^a	10	8.1 ^b
Total	210	16	7.6 ¹	32	15.2 ²

^{a,b} Letras diferentes indican que las proporciones de los estratos de cada columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

^{1,2} Números diferentes indican que las proporciones totales para cada prueba diagnóstica son estadísticamente diferentes ($p < 0.01$)

Finalmente, Peredo (2010) ha realizado un análisis cito-oncológico en el sedimento de 210 muestras de orina tomada por masaje perivulvar de bovinos hembras de Oxapampa. Para tal fin se utilizaron 5 ml de muestra de orina, las cuales fueron sometidas a centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Luego se resuspendió el sedimento y una gota fue colocada en una lámina portaobjetos realizando un frotis por extensión. Se utilizó la tinción Wright y las láminas se observaron con microscopio óptico de luz utilizando objetivos convencionales. Esta prueba no invasiva, cualitativa, de cito-oncología fue efectiva pues se hallaron células cancerígenas en la muestra urinaria de 64 casos (30.47%) además no es compleja, costosa ni invasiva para ejecutar.



Figura 30. Colección de muestra de orina tras la estimulación de la zona perineal. 2008.

Fuente: Peredo (2010)



Figura 31. Aplicación de capa de colorante Wright sobre la muestra fija en el portaobjetos.

Fuente: Peredo (2010)

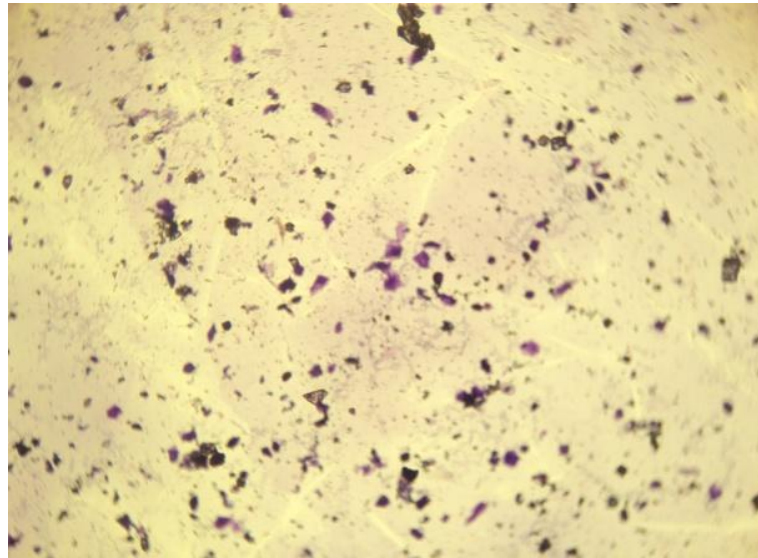


Figura 32. Sedimento urinario de vacuno hembra donde las flechas rojas señalan células exfoliadas uroteliales normales y las flechas verdes señalan grupos de eritrocitos (Tinción Wright 4X).

Fuente: Peredo (2010)

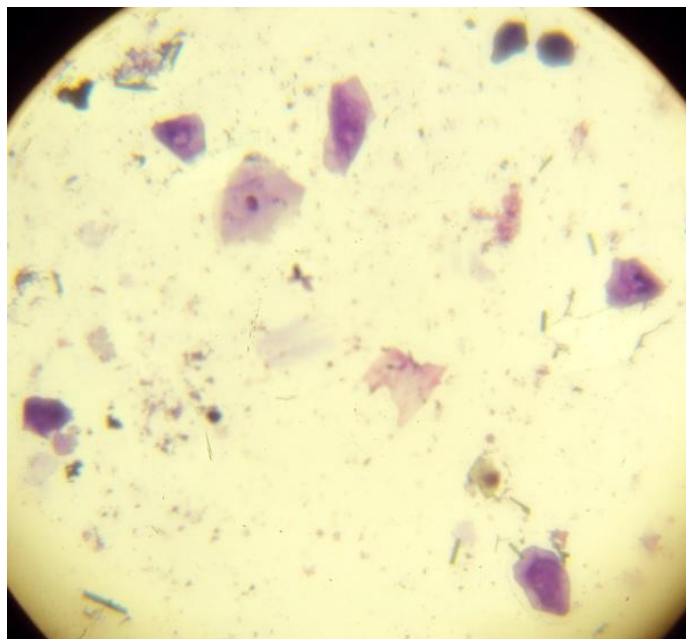


Figura 33. Sedimento urinario de vacuno hembra donde se aprecian grupos de células epiteliales exfoliadas uroteliales de apariencia normal (Tinción Wright 40X).

Fuente: Peredo (2010)

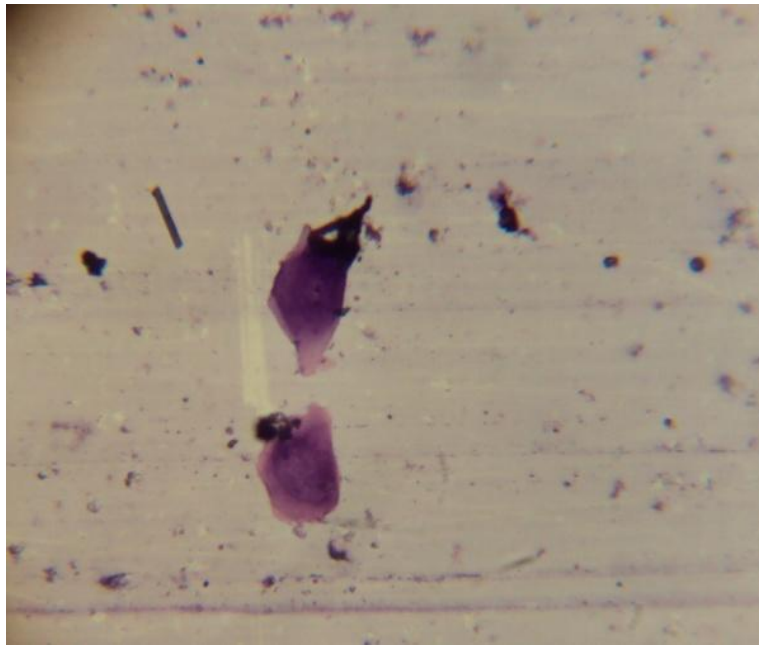


Figura 34. Sedimento urinario donde la flecha roja señala una célula epitelial atípica de citoplasma levemente basófilo y de gran tamaño nuclear, exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X). Cambiar por figura 25.

Fuente: Peredo (2010)

III. CONCLUSIONES

1. La Hematuria Vesical Enzoótica Bovina es una enfermedad que aún está pobremente comprendida en nuestro país debido a la escasez de estudios de índole científico.
2. A pesar de la escasez de reportes oficiales, la provincia de Oxapampa es la más afectada en nuestro país, con una prevalencia reportada en el 2009 de 26.1%, sin embargo esta enfermedad podría estar presente en otras áreas.
3. En nuestro país la prueba diagnóstica más utilizada es la histopatología sin embargo sólo puede hacerse post-mortem o mediante técnicas invasivas como la biopsia **de muy difícil abordaje**.
4. Recientemente se han desarrollado en nuestro país el urianálisis y la cito-oncología específicas para HVEB. La inmunohistoquímica también se está desarrollando pero puede no estar al alcance de todos.
5. El urianálisis y la cito-oncología pueden hacerse en campo debido a su fácil ejecución y poco costo y son pruebas no invasivas que pueden realizarse tempranamente para detectar animales afectados que no muestran signos clínicos obvios.

IV. RECOMENDACIONES

- 1.** Deben realizarse estudios para detectar la excreción de ptaquilósido en la leche, así como sobre residuos del mismo en la carne de los bovinos afectados para implementar medidas de prevención desde el punto de vista de salud pública.
- 2.** Se deben alentar los estudios para comprender mejor esta enfermedad debido a que tiene mucha importancia económica en nuestro país.
- 3.** Son necesarios más estudios sobre las técnicas de diagnóstico de fácil ejecución para la HVEB como la ecografía, el urianálisis y la citoncología. Actualmente no hay ningún estudio en el país sobre el uso de la ecografía para el diagnóstico de HVEB.

V. LITERATURA CITADA

1. **Alonso-Amelot ME. 1999.** Helecho macho, salud animal y salud humana. Rev. Fac. Agron. (LUZ) (Venezuela) 16: 528-541.
2. **Alonso-Amelot ME, Castillo U, Smith BL, Lauren DR. 1998.** Excretion, through milk, of ptaquiloside in bracken-fed cows. A quantitative assessment. Lait 78: 413-423.
3. **Ambrosio V, Borzacchiello G, Bruno F, Galati P, Roperto F. 2001.** Uroplakin expression in the urothelial tumors of cows. Vet Pathol 38: 657-660.
4. **Anjos BL, Irigoyen LF, Figuera RA, Gomes AD, Kommers GD, Barros CSL. 2008.** Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 28 (10): 501-507.
5. **Aubron C, Cochet H. 2009.** Producción lechera en los Andes peruanos: ¿integración al mercado interno o marginación económica?. Anuario Americanista Europeo 6-7: 217-238.
6. **Balcos LGF, Borzacchiello G, Russo V, Popescu O, Roperto S, Roperto F. 2008.** Research in Veterinary Science 85: 145-148.
7. **Bidault C. 2009.** Urologie et nephrologie des ruminants. These Doctorat Veterinaire. École Nationale Veterinaire D'Alfort. 315 p.
8. **Blowey RW, Weaver AD. 2003.** Toxicological disorders. In: Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. 2rd ed. St Louis: Elsevier/Mosby. p 209-210.

9. **Borzacchiello G, Ambrosio V, Galati P, Perillo A, Roperto F. 2003.** Cyclooxygenase-1 and -2 expression in urothelial carcinomas of the urinary bladder in cows. *Vet Pathol* 40: 455-459.
10. **Braun JP, Lefebvre HP. 2008.** Kidney function and damage. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, Eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. San Diego: Academic Press. p. 485-528.
11. **Carlyle T, Duncan R. 1990.** Patología Veterinaria. Vol. 2. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. p. 966-969.
12. **Champagne A. 2004.** Toxicologie vegetale et troubles urinaires chez les ruminants. These Doctorat Veterinaire n° 103. École Nationale Veterinaire de Lyon. Université Claude Bernard. 133 p.
13. **Clarke EGC, Clarke ML. 1970.** Toxicología Veterinaria. Zaragoza: Ed. ACRIBIA, S.A. p. 343-346.
14. **Dawra RK, Kurade NP, Sharma OP. 2002.** Carcinogenicity of the fern *Pteridium aquilinum* collected from enzootic bovine haematuria-free hilly area in India. *Current Science* 83 (8): 1005-1009.
15. **Delgado M, Rojas D, Tamayo E, Usma M, Almansa J. 2009.** Hematuria enzoótica bovina, una patología olvidada en Colombia. *Boletín de la facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, Universidad Antonio Nariño (Colombia)* 2: 21-26.
16. **Divers TJ. 2008.** Urinary tract diseases. In: Divers TJ, Peek SF, Eds. *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2nd ed. Missouri: Saunders Elsevier. p. 447-466.
17. **França T, Hubinger C, Vargas P. 2002.** Enfermidades determinadas pelo princípio radiomimético de *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). *Pesq. Vet. Bras.* 22 (3): 85-96.
18. **Gamarra M. 2001.** Situación actual y perspectivas de la ganadería lechera en la cuenca de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 12 (2): 1-13.
19. **Giles CJ, Andrews AH. 2004.** Major Poisonings. In: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, Eds. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Oxford: Blackwell Science. p. 946-947.

- 20. González CE. 2003.** Frecuencia y caracterización anatomo-histopatológica de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria en Oxapampa-Pasco. Tesis para optar el título de Medico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72 p.
- 21. González C, Chavera A, Perales R, Falcón N, Evaristo R. 2004.** Caracterización de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria vesical enzoótica en la zona de Oxapampa, Pasco. Rev Inv Vet Perú 15 (1): 25-36.
- 22. González S, Carpio M. 1973.** Informe de un caso de hematuria vesical crónica bovina en la selva peruana. Rev. Inv. Pec. (Perú) 2 (1): 109.
- 23. Grant M, Newman SJ. 2007.** Urinary System. In: Grant M, Ed. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol 2. 5th ed. Elsevier Health Sciences. Pp. 426-522.
- 24. Gründer HD. 2005.** Enfermedades de los órganos urinarios. En: Dirksen G, Gründer H, Stöber M, Eds. Medicina interna y cirugía del bovino. 4ta Ed. Vol. 2. Buenos Aires: Inter-Médica. p. 665-667.
- 25. Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. 1998.** Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. Vol. II. Pp. 28-70.
- 26. Herencia K. 2009.** Prevalencia de hematuria vesical enzoótica bovina mediante urianálisis en el distrito de Chontabamba - Oxapampa - Pasco. Tesis para optar el título de Medico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Cayetano Heredia. 23 p.
- 27. Hoque M, Somvanshi R, Singh GR, Mogha IV. 2002.** Ultrasonographic evaluation of urinary bladder in normal, fern fed and enzootic bovine haematuria-affected cattle. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 49 (8): 403-407.
- 28. Höfle U. 2001.** Técnicas de diagnóstico post-mortem: necropsia y toma de muestras. Sevilla: Aquila foundation y Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas, P. 23.
- 29. Jackson PGG, Cockcroft PD. 2002.** Clinical Examination of Farm Animals. Oxford: Blackwell Science, P. 313.

- 30. Jurado SB, Petruccelli MA. 2005.** Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico. *Analecta Veterinaria* 25 (1): 18-24.
- 31. Lioi MB, Barbieri R, Borzacchiello G, Dezzi S, Roperto S, Santoro A, Russo V, Roperto F. 2004.** Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. *J. Comp. Path.* 131: 233-236.
- 32. López H. 1983.** Incidencia de la hematuria enzoótica del ganado vacuno en la provincia de Oxapampa. Tesis Bachillerato Fac. Cienc. Agrop. Univ. Nac. Daniel Alcides Carrión. Oxapampa. 50 p.
- 33. Lorgue G, Lechenet J, Riviere A. 1997.** Toxicología clínica veterinaria. Zaragoza: Ed. ACRIBIA, S.A. p. 136-137.
- 34. Marçal WS. 2003.** A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina 24 (1): 197-208.
- 35. Marín R, Lloberas M, Vignale D, Odriozola E. 2004.** Toxicidad natural del *Pteridium aquilinum* (helecho) en bovinos y su importancia en humanos. *Vet. Arg.* 21 (206): 413-420.
- 36. Marrero E, Bulnes C, Sánchez LM, Palenzuela I, Stuart R, Jacobs F, Romero J. 2001.** *Pteridium aquilinum* (Bracken fern) toxicity in cattle in the Humid Chaco of Tarija, Bolivia. *Vet Human Toxicol* 43 (3): 156-158.
- 37. McWhirter L, Kemp H. 2010.** Bracken fern. *Primefacts* 730: 1-5.
- 38. Mengi AK, Nauriyal DC, Singh R, Dhan NK. 2001.** Haematological and biochemical observations on the blood of cattle suffering from chronic bovine haematuria. *Indian Vet. J* 78: 994-996.
- 39. [MINAG] Ministerio de Agricultura. 2010.** Dirección general de información agraria. Dirección de estadística. [Internet], [3 Mayo 2010]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe>.
- 40. Montes K. 2007.** Inmunodiagnóstico de neoplasias vesicales en bovinos con hematuria vesical enzoótica bovina utilizando la anti-citoqueratina y anti-vimentina. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 71 p.

- 41. Moreira M, Kommers GD, Barros CS, Rech RR, Piazer JVM. 2006.** Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria 36 (5): 1647-1650.
- 42. Olivera L. 2001.** Sanidad del ganado lechero de la cuenca del sur. *Rev Inv Vet Perú* 12 (2): 78-86.
- 43. Pamukcu AM. 1974.** IV. Tumours of the urinary bladder. *Bull. Wld Hlth Org.* 50: 43-52.
- 44. Pamukcu AM, Price JM, Bryan GT. 1976.** Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors: clinical and morphological characteristics. *Vet Pathol* 13: 110-122.
- 45. Peredo F. 2010.** Citooncología urinaria como método de ayuda de diagnóstico en la hematuria vesical enzoótica bovina. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 53 p.
- 46. Prasad MC, Iyer PKR. 1986.** Enzootic bovine haematuria: clinical and pathomorphological studies. *Acta Vet. Brno* 55: 343-351.
- 47. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** Enfermedades producidas por toxinas vegetales, de hongos, cianofitos, clavibacterias y venenos de garrapatas y animales vertebrados. En: *Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino*. Vol. II, 9^{na} ed. Madrid: McGrawHill-Interamericana. p. 1973-1974.
- 48. Ramos M. 2009.** Evaluación anatomopatológica de tejidos anómalos en cobayos (*Cavia porcellus*) por consumo de helecho común (*Pteridium aquilinum*) como modelo experimental animal para bovinos con HVEB. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 60 p.
- 49. Rasmussen LH. 2003.** Ptaquiloside - An environmental hazard? Occurrence and fate of a Bracken (*Pteridium* sp.) toxin in terrestrial environments. Thesis for Ph. D. Denmark: The Royal Veterinary and Agricultural University. 124 p.
- 50. Rebhum WC. 1995.** Enfermedades del ganado vacuno lechero. Zaragoza: Ed. ACRIBIA, S.A. p. 473-474.

- 51. Resendes AR, Roperto S, Trapani F, Urraro C, Roperto F, Borzacchiello G. 2010.** Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago. Research in Veterinary Science In Press. Febrero 2010.
- 52. Riet-Correa F, Schild AL, Mendez MC, Lemos RAA. 2001.** Doenças de ruminantes e eqüinos. Vol. II. Livraria Valera, São Paulo, p. 266-268.
- 53. Roder JD. 2002.** Manual de toxicología veterinaria. Barcelona: Multimédica S.A. 355 p.
- 54. Roperto S, Borzacchiello G, Casellato R, Galati P, Russo V, Sonnino S, Roperto F. 2007.** Sialic acid and GM3 gangliósíde expression in papillomavirus-associated urinary bladder tumours of cattle with chronic enzootic haematuria. J. Comp. Path. 137: 87-93.
- 55. Sánchez A, Árraga CM, García D, Pino D, Villarroel R, Boscán J. 2004.** Observaciones clínico patológicas en vacas con hematuria enzoótica bovina. Revista Científica (Venezuela) 14 (4): 317-323.
- 56. Sánchez A, Árraga CM, Villarroel R, Pino D, García D, Sánchez G. 2006.** Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela) 16 (6): 604-612.
- 57. Sánchez A, Elsen JP, Almeida IA, Sánchez G. 2008.** Fases intermedias y simultáneas de los síndromes crónicos de la intoxicación por consumo de genotipos del *Pteridium* en bovinos. Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela) 18 (5): 531-541.
- 58. Sánchez A, García D, Alvarado CM, Villegas M, Palacios E. 1999a.** Estudio ultraestructural de la vejiga urinaria en la hematuria enzoótica bovina. Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela) 9 (3): 196-204.
- 59. Sánchez A, García D, de Alvarado CM, Villegas M, Villarroel R, Jiménez U. 1999b.** Factores de riesgo asociados con hematuria enzoótica bovina en el Municipio Campo Elías, Estado Mérida, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela) 9 (5): 378-387.

- 60. Sánchez A, Villarroel R, Pino D, García D, Molero G, Carrasco D. 2003.** Evaluación comparativa de diferentes métodos de control de la hematuria enzoótica bovina. *Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela)* 13 (1): 33-37.
- 61. Sandoval J, Sánchez A, Pino D, Villarroel R, Alvarado M, García D. 2002.** Estudio ultrasonográfico de la vejiga urinaria en la hematuria enzoótica bovina. *Revista Científica, FCV-LUZ (Venezuela)* 12 (5): 346-350.
- 62. Sardon D, de la Fuente I, Calonge E, Pérez-Alenza MD, Castaño M, Dunner S, Peña L. 2005.** H-ras immunohistochemical expresión and molecular análisis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *J. Comp. Path.* 132: 195-201.
- 63. Saveria M, Jarrett FH, Barron R, O'Neil BW, Smith KT. 1992.** Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer research* 52: 6898-6904.
- 64. Sheen S, Riesco A. 2002.** Factores que afectan la producción de leche en vacas de doble propósito en Trópico húmedo (Pucallpa). *Rev Inv Vet Perú* 13 (1): 25-31.
- 65. Silva MA, Scárdua CM, Dórea MD, Carvalho L, Freire IV, Molinari D. 2009.** Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008. *Ciência Rural, Santa Maria* 39 (6): 1847-1850.
- 66. Somvanshi R, Ravisankar R. 2004.** Recent advances in bracken fern toxin research. *Natural Product Radiance* 3 (4): 304-308.
- 67. Somvanshi R, Lauren DR, Smith BL, Dawra RK, Sharma OP, Sharma VK, Singh AK, Gangwar NK. 2006.** Estimation of the fern toxin, ptaquiloside, in certain Indian ferns other than bracken. *Current Science* 91 (11): 1547-1552.
- 68. Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz OP, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Pereira CAB, Beçak W. 1998.** Bovine papillomavirus transmisión and chromosomal aberrations: an experimental model. *Journal of general Virology* 79: 2127-2135.

- 69. Vargas P, França T, Barros CSL, Tokarnia C.H. 2003.** Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 23 (2): 65-81.
- 70. Velarde. 1991.** Manual de enfermedades del ganado vacuno y ovino en la selva central. Proyecto Especial Pichis Palcazu. Oxapampa. 54 p.
- 71. Verde G. 2009.** Diagnóstico clínico de la hematuria vesical enzoótica bovina por urianálisis en vacunos de la provincia de Oxapampa, Pasco. Tesis para optar el título de Medico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Cayetano Heredia. 28 p.
- 72. Villalobos J. 1985.** Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, CCSS 131-141.